

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Untersuchung des Einflusses von neuen endodontischen
Sealern auf orale Zellen *in vitro*: Toxizitätsanalysen,
Entzündungskaskade und mögliches regeneratives
Potential**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Teresa Elisabeth Forstner

aus

Dachau

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Franz-Xaver Reichl

PD Dr. rer. biol. hum. Dipl. Ing. (FH)
Bogna Stawarczyk, MSc

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Grundlagen der Endodontie	6
1.1.1	Anatomie des Zahnes.....	6
1.1.2	Ätiologie pulpaler Erkrankungen.....	6
1.1.3	Arten der Pulpaerkrankungen.....	7
1.1.3.1	Pulpitis.....	7
1.1.3.2	Nekrose des Pulpagewebes	8
1.1.3.3	Parodontitis apicalis.....	9
1.1.3.3.1	Ätiologie und Pathogenese.....	9
1.1.3.3.2	Entzündungsreaktion.....	9
1.1.3.3.3	Klinisches und röntgenologisches Erscheinungsbild	12
1.1.3.3.4	Heilungsprozess	12
1.1.4	Behandlungstechniken in der Endodontie	13
1.1.5	Ursachen für Misserfolge.....	16
1.2	Sealer.....	17
1.2.1	Grundsätzliche Anforderungen an Sealer.....	17
1.2.2	Klassifizierung von Sealern	20
1.2.2.1	Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis.....	20
1.2.2.2	Sealer auf Epoxidharzbasis	21
1.2.2.3	Sealer auf Salicylat-Basis mit Kalziumhydroxid	23
1.3	Reparatur-Materialien.....	25
1.3.1	Hydraulische Silikatzemente	25
1.3.1.1	ProRootMTA.....	25
1.3.1.2	MedCem MTA	27
1.3.2	Bioaktive Kalzium-Silikat-Zemente	27
1.4	Total Fill BC Sealer (Total Fill BCS)	28
1.5	Total Fill Root Repair Material (Total Fill RRM).....	30
2	Ziel der Untersuchung	33
3	Material und Methode	34
3.1	Zellarten und Zellkulturbedingungen	34

3.2	Routinemethoden in der Zellkultur	35
3.2.1	Zellen auftauen.....	35
3.2.2	Mediumwechsel.....	35
3.2.3	Subkultivierung der Zellen	35
3.2.4	Bestimmung der Zellzahl	36
3.3	Herstellung der Sealereluat	36
3.4	Spezielle Methoden und Anwendungen	37
3.4.1	Herstellung von zytosolischen und nukleären Proteinextrakten.....	37
3.4.2	Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford Assay	38
3.4.3	Zytotoxizitätsuntersuchung mittels WST-8.....	38
3.4.4	Untersuchung der Apoptoseinduktion mittels Caspase-Assay	40
3.4.5	Genotoxizitätsnachweis mittels Mikronukleus-Test	41
3.4.6	Einfluss der Sealereluat auf die zelluläre Entzündungskaskade	44
3.4.6.1	EIA zur Bestimmung der PGE ₂ -Konzentration.....	44
3.4.6.2	ELISA zur Bestimmung der IL-6-Konzentration	47
3.4.6.3	Immunochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors NFκB	49
3.4.7	Untersuchung einer möglichen osteogenen Differenzierung	51
3.4.7.1	ELISA auf Osteocalcin.....	51
3.4.7.2	Immunochemischer Nachweis von RUNX2	53
3.4.7.3	Immunzytochemischer Nachweis von Markerproteinen.....	53
3.5	Statistische Auswertung.....	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Zytotoxizitäts- und Genotoxizitätsuntersuchungen	56
4.1.1	WST-8	56
4.1.2	Caspase-3 Assay	57
4.1.3	Mikronukleus Assay.....	58
4.2	Beeinflussung des Entzündungsgeschehens	59
4.2.1	EIA auf PGE ₂	59
4.2.2	ELISA auf IL-6	61
4.2.3	Western Blot auf iκBα.....	62
4.3	Einfluss auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen	62
4.3.1	ELISA auf Osteocalcin.....	62

4.3.2	Western Blot auf RUNX2	63
4.3.3	Immunzytochemische Untersuchungen.....	64
5	Diskussion	66
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literaturverzeichnis	82
8	Abbildungsverzeichnis	95
9	Tabellenverzeichnis	96
10	Abkürzungsverzeichnis	96
11	Rezepte	98
12	Danksagung.....	99

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Endodontie

Während früher die Behandlungsschwerpunkte der Zahnmedizin vor allem im Ersatz fehlender Zähne durch herausnehmbaren oder festsitzenden Zahnersatz lagen, wird heute immer mehr dem Prinzip der minimalinvasiven Zahnmedizin und dem Wunsch des Patienten nach Erhalt seiner natürlichen Zähne gefolgt. Dadurch haben in den letzten Jahrzehnten zahnerhaltende und damit besonders endodontische Maßnahmen zunehmend an Bedeutung gewonnen (Micheelis und Schiffner, DMS IV, 2005).

1.1.1 Anatomie des Zahnes

Der menschliche Zahn besteht aus Schmelz, Zement, Dentin und einem Weichgewebskern, der Pulpa. Histologisch findet sich in der Pulpa ein lockeres Bindegewebe mit gelartiger Konsistenz. Dieses enthält kollagene und präkollagene Fibrillen und Fasern, Lymph- und Blutgefäße sowie Nerven und Zellen (Magloire *et al.*, 1983). Fibroblasten, Odontoblasten und Abwehrzellen stellen die grundsätzlich vorkommenden Zellarten dar (Bergenholtz *et al.*, 1985). Die Pulpa steht über das Foramen apicale, laterale und interradiikuläre Kanäle mit dem Parodontium in Verbindung. Zudem bildet es mit dem Dentin eine Einheit, denn das Dentin besitzt Dentinkanälchen, die von der Pulpa Richtung Schmelz verlaufen und im Inneren die Fortsätze der Odontoblasten mit sich führen (Goldberg und Lasfarques, 1995).

1.1.2 Ätiologie pulpaler Erkrankungen

Aufgrund ihrer exponierten Stellung sind die Zähne und damit auch ihr Endodont ständig verschiedenen Gefährdungen ausgesetzt, in deren Folge es zu pulpalen Erkrankungen kommen kann. Grundsätzlich kann eine Pulpaschädigung durch chemische, mechanische, bakterielle, osmotische und thermische Reize auftreten. Die Hauptursache für eine Pulpaerkrankung ist mit 95% aber eine Bakterieninvasion aufgrund einer vorliegenden Karies profunda (Schäfer, 2001). Neben der infektiös bedingten Pulpaerkrankung können jedoch auch iatrogene Ursachen vorliegen. Denn bei zahnärztlichen Maßnahmen kann es zu chemischen

und physikalischen Reizungen der Pulpa kommen. Im Zuge einer Füllungstherapie besteht beispielsweise die Gefahr, dass die Bestandteile des Füllungsmaterials die Pulpa reizen (Schmalz, 1998). Aber auch bei ausgedehnten Kavitätenpräparationen können durch den entstehenden Druck, die Erhöhung der Temperatur und durch das Austrocknen des Dentins Pulpaschädigungen entstehen (Kwon *et al.*, 2013). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass auch durch insuffiziente Restaurationen Bakterien eindringen und die Pulpa reizen können (Kerschbaum und Voß, 1981). Darüber hinaus können Traumata der Auslöser für Erkrankungen der Pulpa sein. Zum einen kann es bei großflächigen Eröffnungen der Pulpa im Rahmen einer komplizierten Kronenfraktur mit Invasion pathogener Keime zu einer Pulpitis kommen, zum anderen können auch Zahnluxationen mit einer Abtrennung des Gefäßnervenstrangs zu einer Pulpaschädigung führen und eine Wurzelkanalbehandlung erforderlich machen (Rocha *et al.*, 2015).

1.1.3 Arten der Pulpaerkrankungen

Die entzündlichen Reaktionen der Pulpa auf einen Reiz können in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden. Da die einzelnen Stadien teilweise nur kurzzeitig existieren oder nebeneinander auftreten, ist die Diagnostik häufig sehr schwierig.

1.1.3.1 Pulpitis

Die Pulpitis bezeichnet eine Entzündung der Pulpa, die durch ausreichend lang anhaltende oder starke Reize auftreten kann. Die Pulpitis kann sowohl ätiologisch in eine infektiöse, traumatische und iatrogene Pulpitis unterteilt werden, als auch pathogenetisch in die Hyperämie, die Pulpitis serosa und die Pulpitis purulenta (Tinkl *et al.*, 1977). Die Unterscheidung der verschiedenen pathogenetisch vorhandenen Formen ist jedoch häufig problematisch und klinisch weitgehend bedeutungslos. Entscheidend für das Entstehen einer Pulpitis ist das Vorhandensein von Bakterien und deren Metaboliten. Dies wurde von Kakehashi 1965 in seinen Tierversuchen mit Ratten gezeigt (Kakehashi *et al.*, 1965). Die Eintrittspforten hierfür sind die freiliegende Pulpa, Dentin- oder Seitenkanälchen (Bergenholtz und Warfvinge, 1982). Pathogenetisch entwickelt sich eine Pulpitis grundsätzlich wie jede andere Entzündung. Aufgrund der Ummantelung der Pulpa

mit Hartgewebe ergeben sich jedoch spezifische Verlaufsformen. In der initialen zellulären Phase kommt es vor allem zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Odontoblastenschicht. Mit zunehmender Infektion finden sich Zellen der spezifischen Abwehr, wie Plasmazellen und Lymphozyten (Stashenko *et al.*, 1998). Es folgt die vaskuläre Phase, die durch einen Anstieg des Blutflusses, einer erhöhten Permeabilität und einer Flüssigkeitsansammlung im Gewebe gekennzeichnet ist (Torneck, 1981). Wenn der ursächliche Reiz zu diesem Zeitpunkt entfernt wird, ist eine Ausheilung in der Regel möglich. Hält der Reiz dagegen an, kommt es in der Folge zum Zelltod von Granulozyten mit der gleichzeitigen Freisetzung von proteolytischen Enzymen und toxischen zellulären Komponenten (Langeland, 1981). Zumeist beschränkt sich dieser Zustand auf das Areal, in dem der Reiz aufgetreten ist, und betrifft nicht die vollständige Pulpa. Der Reiz auf das Endodont bewirkt neben dem entzündlichen Prozess auch eine Sklerosierung der Dentintubuli (Frank und Voegel, 1980), die mit einer Verengung der Kanälchen einhergeht, und eine Bildung von Tertiärdentin an der Pulpa-Dentin-Grenze. Folgt nun keine Behandlung kommt es zum Voranschreiten der Entzündung, die sich vor allem in apikaler Richtung ausdehnt und letztlich zu einer Nekrose der Pulpa führt (Lin und Langeland, 1981).

1.1.3.2 Nekrose des Pulpagewebes

Bei der Pulpanekrose handelt es sich um einen irreversiblen Zustand, der durch einen Gewebeerfall charakterisiert ist. Die Nekrose kann lokal auftreten, aber auch die gesamte Kronen- und Wurzelpulpa ausfüllen (Schroeder, 1991). Die Hauptursache für eine Pulpanekrose ist eine bakterielle Infektion, in deren Rahmen es zu hohen Endotoxinkonzentrationen innerhalb der Pulpa kommt, die wiederum toxisch sind und dadurch die Gewebenekrose herbeiführen (Pinero *et al.*, 1983). Ein wichtiger Aspekt ist, dass sobald die Pulpa durch die Karies freigelegt wird, immer eine Nekrotisierung des Kronenpulpagewebes eintritt (Lin und Langeland, 1981).

1.1.3.3 Parodontitis apicalis

Neben der Pulpitis und der Pulpanekrose ist die Parodontitis apicalis eine weitere Form der Pulpaerkrankungen, welche sich aus den beiden Erstgenannten entwickeln kann.

1.1.3.3.1 Ätiologie und Pathogenese

In den meisten Fällen ist die Parodontitis apicalis die Folge einer unbehandelten Pulpitits, aber auch Traumata, Parodontopathien und endodontische Behandlungsmaßnahmen und -fehler können der Auslöser dafür sein (Nair, 2006). Eine periapikale Läsion entsteht letztendlich aber genauso wie auch die Pulpitis nur durch die Anwesenheit von Bakterien im Wurzelkanalsystem (Takehashi *et al.*, 1965). Die hier vorkommende Flora ist zwar polymikrobiell, stellt aber nur ein eingeschränktes Spektrum der in der Mundhöhle vorkommenden Vielfalt mit vor allem gramnegativen und anaeroben Stäbchen und Peptostreptokokken dar (van Winkelhoff, 1985). Die Pathogenese der Parodontitis apicalis ähnelt der der Pulpitis. Zusätzlich invadieren die Mikroorganismen, die im Wurzelkanal etabliert sind, jetzt auch das apikale Parodont, führen zu einer Knochendestruktion und lösen dort eine Immunreaktion aus, welche einen Verteidigungsmechanismus des Körpers, mit dem Ziel die Infektion auf den Wurzelkanal zu begrenzen, darstellt (Stashenko *et al.*, 1998).

1.1.3.3.2 Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion ist sehr komplex und besteht aus verschiedensten Elementen. Die akute Phase ist vor allem durch eine unspezifische Immunantwort gekennzeichnet, in der es zur Migration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten kommt (Nair und Schroeder, 1985). Die Entzündung bringt auch Veränderungen auf molekularer Ebene mit sich. Bakterien und Zytokine, die als Stimuli wirken, führen über Signalkaskaden zu einer Produktion von Entzündungsmediatoren (Levy, 1997; Smith *et al.*, 2000). Als Beispiel ist das Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu nennen, das im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine besondere Bedeutung hat (Stanczyk *et al.*, 2001). Gebildet wird es durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche durch Bakterienbestandteile, wie Lipopolysaccharide (LPS), und das Interleukin-1 β (IL-1 β) aktiviert wird. Durch die

gesteigerte Produktion von PGE_2 kommen dessen Wirkungen zum Tragen. Es erhöht sich unter anderem die Gefäßpermeabilität und die Schmerzempfindung wird über eine Sensibilisierung der nozizeptiven Nervenendigungen verstärkt (Noguchi und Ishikawa, 2007). Dies ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

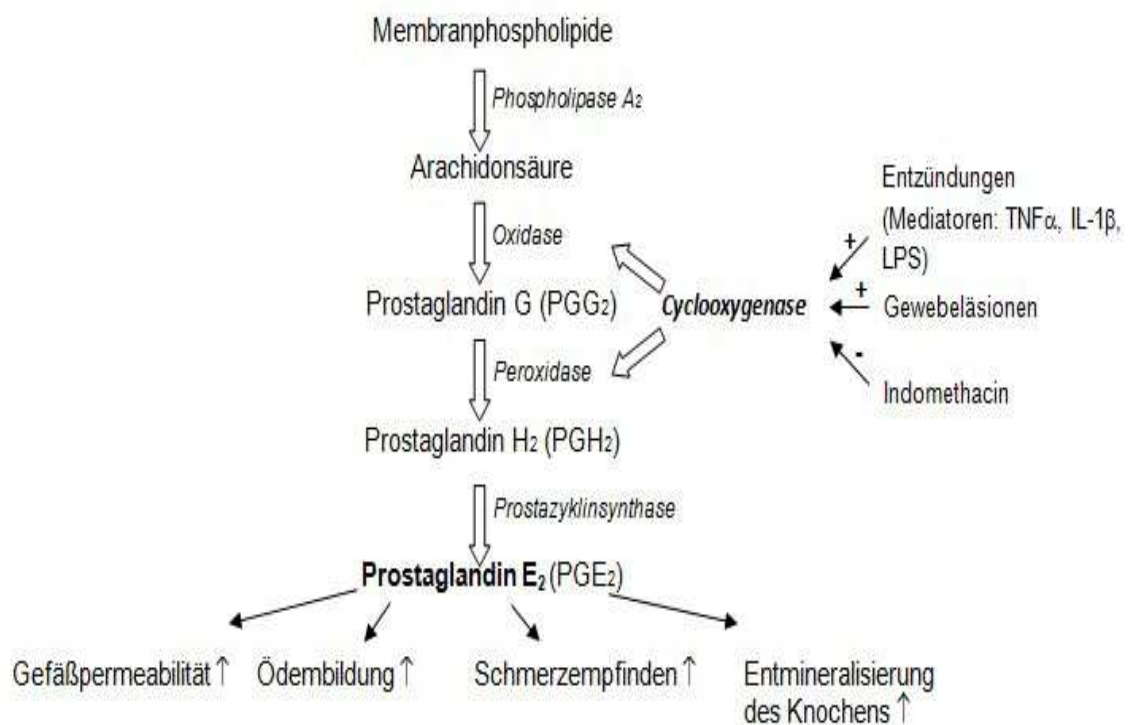


Abbildung 1: Darstellung der Prostaglandin E_2 -Synthese und dessen Wirkungen (modifiziert nach Hein und O'Banion, 2009)

Das hauptsächlich von den Monozyten produzierte und entzündungsfördernde IL-1 β ist ein hochwirksames Zytokin und bewirkt neben der Steigerung der COX-2-Aktivität einen Anstieg neutrophiler Granulozyten, Thrombozyten und Akute-Phase-Proteinen (Rivest *et al.*, 2000). Zudem triggert es die Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6), welches ebenfalls wesentlich an der Regulation der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Es induziert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und wirkt auf T-Lymphozyten antiapoptotisch (Dosseva *et al.*, 2014). Zudem spielt es eine wichtige Rolle, wenn die neutrophilen Granulozyten, die zu Beginn der Entzündung dominieren, in der chronischen Phase durch spezifische Entzündungszellen wie Lymphozyten und mononukleäre Zellen ersetzt werden (Jones, 2005). Die chronische Phase zeichnet sich zusätzlich durch eine

spezifische T- und B-Zell induzierte Antwort aus, wobei die T-Suppressorzellen die Läsion im Sinne einer Chronifizierung stabilisieren (Stashenko *et al.*, 1998). Ein weiterer wichtiger Signalstoff des Immunsystems ist der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Dieser wird überwiegend von Makrophagen ausgeschüttet und ist an der Regulierung der Aktivität von Immunzellen beteiligt (Fenner, 1998). Er wirkt auf Makrophagen phagozytose-stimulierend und steigert die Aktivität der COX-2 (Artese *et al.*, 1991). Zusammen mit dem IL-1 β erhöht er in der akuten Phase der Entzündung die Knochenresorption im periapikalen Bereich, die auch auf die Wurzelspitze des entzündeten Zahnes übergreifen kann (Maleug *et al.*, 1996, Stashenko, 1992). In der chronischen Phase der Entzündung entsteht im Bereich des abgebauten Knochens ein apikales Granulom aus Granulations- und fibrösem Narbengewebe und durch die verstärkte Bildung von Interferon γ und Interleukin-4 kommt es zu einer Regression der Knochenresorption (McKinney, 1981).

Der spezifische Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B), der ebenfalls im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen zu nennen ist, kann die Transkription von bestimmten Genen beeinflussen und so die Immunantwort, die Zellproliferation und den Zelltod regulieren (Karin und Ben-Neriah, 2000). Im Rahmen der Parodontitis apicalis spielt er eine zentrale Rolle (Nichols *et al.*, 2001). Proinflammatorische Zytokine wie der TNF- α und das IL-1 β , sowie Bakterien und bakterielle Produkte aktivieren diesen Faktor, aber auch physikalische und chemische Einflüsse können das NF- κ B-System anregen (Sen und Baltimore, 1986). Das inhibitorische Protein I κ B α bildet mit NF- κ B einen Komplex, wodurch dieser im Zytoplasma gehalten wird (Karin und Ben-Neriah, 2000). Eine Aktivierung des I κ B α -Kinase-Komplexes durch beispielsweise TNF- α führt zur Phosphorylierung der I κ B α -Proteine, die von einer Ubiquitinylierung und dem Abbau dieser Proteine im Proteasom gefolgt ist (Nelson *et al.*, 2004). Dadurch wird NF- κ B freigesetzt und kann in den Zellkern übertreten. Dort induziert es die Expression zahlreicher Gene unter anderem für Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren. In der folgenden Abbildung 2 wird der Aktivierungsweg von NF- κ B dargestellt.

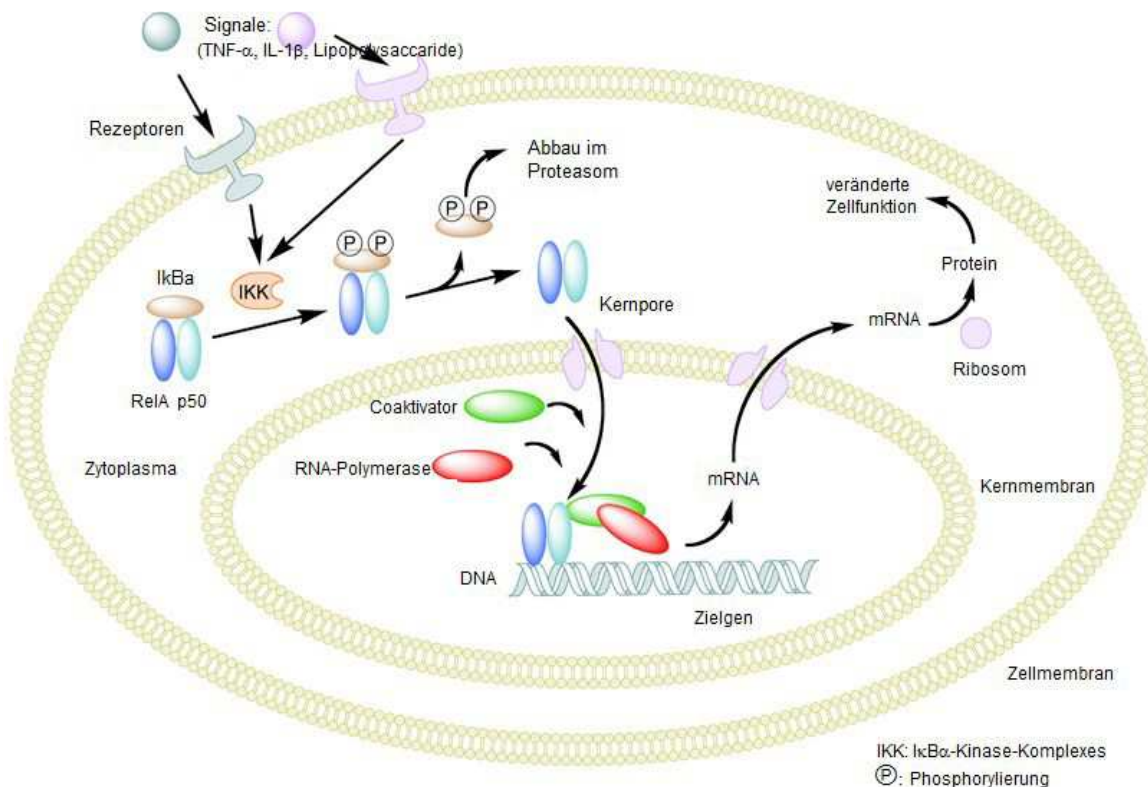


Abbildung 2: Aktivierungsweg von NFκB (Brasier, 2006)

1.1.3.3.3 Klinisches und röntgenologisches Erscheinungsbild

Die Parodontitis apicalis acuta und chronica unterscheiden sich auch im klinischen Erscheinungsbild. Die akute Form ist durch starke Schmerzen, Schwellung, erhöhte Klopf- und Druckschmerzhaftigkeit sowie ein Gefühl der Zahnelongation gekennzeichnet, während die chronische Form asymptomatisch über viele Jahre bestehen kann (Lin *et al.*, 1984). Das röntgenologische Erscheinungsbild der Parodontitis apicalis acuta ist meist unauffällig und nur selten liegt im apikalen Bereich ein erweiterter Desmodontalspalt vor. Im Gegensatz dazu ist dieser in der chronischen Form in der Regel erweitert und eine apikale Aufhellung im Sinne einer Knochenläsion ist sichtbar (Seltzer *et al.*, 1963).

1.1.3.3.4 Heilungsprozess

Nach erfolgter endodontischer Behandlung wird eine Heilung der periapikalen Knochenläsion durch Knochenregeneration angestrebt. Dazu ist eine Differenzierung von multipotenten, mesenchymalen Stammzellen zu reifen Osteoblasten notwendig, welche von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und

Matrixproteinen abhängig ist (Francheschi *et al.*, 2007). Ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung ist beispielsweise der runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (Komori und Kishimoto, 1998). RUNX2 wird erstmals in den Zellen der mesenchymalen Reihe exprimiert, sobald determiniert ist, dass sich diese zu Osteoblasten differenzieren (Ducy, 2000). Neben der Bedeutung für die Osteoblastendifferenzierung spielt RUNX2 außerdem bei der Knochenmatrixablagerung von differenzierten Osteoblasten eine wichtige Rolle. Eine wesentliche Funktion im Rahmen der Osteoblastendifferenzierung haben auch die Proteine Osteonectin, Osteocalcin und OPN (Osteopontin) (Ram *et al.*, 2015). Osteonectin wird während der Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu reifen Osteoblasten exprimiert und ist entscheidend für die Knochenumwandlung und den Erhalt der Knochenmasse (Baldini *et al.*, 2008). Beim Osteocalcin handelt es sich um ein nicht-kollagenes Knochenmatrixprotein, das als knochenspezifischer Marker die Osteoblastenaktivierung in Bezug auf die Osteoidbildung und die Knochenumwandlung widerspiegelt (Zaitseva *et al.*, 2015). Osteopontin ist ein Glykoprotein, das während Heilungsprozessen und Entzündungsreaktionen verstärkt gebildet wird und das eine Vielzahl von Funktionen besitzt. Es wirkt immunmodulierend, bewirkt die Chemotaxis von Entzündungszellen, hat antiapoptotische Eigenschaften und ist für die Nukleation von Hydroxylapatit und damit für die Mineralisation verantwortlich (Standal *et al.*, 2004). Als letztes ist noch das Glykoprotein Fibronectin zu erwähnen, das an der Wundheilung beteiligt ist und über die Bindung von mesenchymalen Stammzellen an Integrine zum Prozess der Osteoblastendifferenzierung beiträgt (Ohgushi und Caplan, 1999). Da die Regeneration des Knochens entscheidend für die Heilung und den Erfolg einer endodontischen Therapie ist, werden heute Materialien für die Füllung der Wurzelkanäle entwickelt, welche die osteogene Differenzierung von Stammzellen und somit die Knochenneubildung fördern sollen.

1.1.4 Behandlungstechniken in der Endodontie

Die Endodontie befasst sich zum einen mit der Vitalerhaltung der Pulpa und zum anderen mit der Behandlung von Pulpaerkrankungen. Dabei setzt sie sich den langfristigen Erhalt eines funktionsfähigen Zahnes als primäres Ziel. Die Therapie

einer Pulpaerkrankung geschieht in der Regel durch eine Wurzelkanalbehandlung. In diesem Rahmen ist es notwendig das infizierte und infizierbare Gewebe vollständig zu Entfernen oder zumindest das Wachstum der Bakterien soweit einzudämmen, dass es vom Immunsystem beherrscht werden kann. Dies findet einerseits auf mechanischem Weg statt, indem mit speziellen Instrumenten Pulpagewebereste und im Zuge der Kanalausformung bakteriell infizierte Zahnhartsubstanz entfernt wird, andererseits kommen Spüllösungen, wie beispielsweise NaOCl (Natriumhypochlorit) und EDTA (Ethyldiamintetraacetat), zum Einsatz, welche eine Keimreduktion und eine Entfernung und Auflösung des Debris bewirken. Die Behandlung sollte letztendlich durch einen hermetischen, dreidimensionalen und dauerhaften Verschluss des Kanalsystems abgeschlossen werden (DGZMK, 1999). Dazu eignen sich im Wesentlichen drei verschiedene Fülltechniken.

Die laterale Kompaktion stellt noch immer den Goldstandard aller Fülltechniken dar und wird in der täglichen Praxis am häufigsten eingesetzt (Slaus und Bottenberg, 2002). Nach der Aufbereitung des Wurzelkanalsystems wird ein Masterpoint, der bis zum Endpunkt der Aufbereitung reicht und eine geringe Friktion aufweisen soll, angepasst und in den Wurzelkanal eingeführt, nachdem er im apikalen Bereich mit Sealer beschickt wurde (Wesselink und Kersten 1989; Wilson und Baumgartner, 2003). Im Folgenden kommt ein Spreader zum Einsatz, mit dem der Masterpoint kräftig gegen eine Kanalwand gepresst und somit Platz für akzessorische Stifte geschaffen wird. Diese Stifte sollten bezüglich der Konizität und ISO-Größe (International Organisation for Standardization) identisch mit den Spreadern sein (Wesselink, 1995). Desweiteren sollten nur die Spitzen der ersten akzessorischen Stifte mit Sealer bestrichen werden, um den Sealeranteil möglichst gering zu halten. Letztendlich werden so viele zusätzliche Stifte in den Wurzelkanal eingebracht bis der Spreader nur noch 3-4 mm in den Wurzelkanal eingeführt werden kann. Am Ende werden die Stifte mit einem erhitzten Instrument abgetrennt und dann mit einem ebenfalls erwärmten Stopfer vertikal kondensiert. Ein wesentlicher Nachteil der lateralen Kompaktion besteht in der Gefahr von Wurzellängsfrakturen mit einer Inzidenz von 3,7 % (Pitts *et al.*, 1983).

Mit der im Jahr 1967 erschienenen Veröffentlichung *Filling Root Canals in Three Dimensions* hat Herbert Schilder den Grundstein für ein neues endodontisches Behandlungskonzept gelegt. Nach ihm ist die Schilder-Technik, die auch als vertikale Kondensationstechnik mit warmer Guttapercha bekannt ist, benannt. In dieser Technik wird nach erfolgter Aufbereitung der Wurzelkanäle der Mastercone so ausgewählt, dass der Durchmesser apikal geringfügig größer ist als der des letzten Aufbereitungsinstrumentes, ein Tug back im apikalen Bereich vorliegt und genügend Masse zum Stopfen vorhanden ist (Schilder, 1967). Bevor der Masterpoint in den Wurzelkanal eingebracht wird, muss dieser im apikalen Drittel mit Sealer bestrichen werden. Zusätzlich werden die oberen beiden Drittel des Wurzelkanals mit einem Handlentulo mit Sealer beschickt. Auch in dieser Technik wird eine minimale Schichtstärke des Sealers angestrebt, um das Leckageverhalten günstig zu beeinflussen (Casanova, 1975). Der Masterpoint wird nach dem Einbringen in den Wurzelkanal erhitzt und mit kalten Pluggern nach apikal kondensiert. Dabei dürfen die Plugger den Wurzelkanal nicht berühren, sollen aber gleichzeitig eine möglichst große Fläche der Guttapercha erfassen (Schilder, 1967). Zunächst wird das apikale Drittel kondensiert (down packing) und im Anschluss das mittlere und koronale Drittel abgefüllt (back packing). Das back packing kann mit kleinen Guttaperchastücken erfolgen, die ebenfalls erwärmt und kondensiert werden. Mit der Schilder Technik können sehr gut adaptierte Wurzelkanalfüllungen mit ausgezeichneter apikaler Kontrolle erzielt werden (Wu *et al.*, 2001), mögliche Schrumpfungen des Guttapercha können durch den Druck der Plugger kompensiert werden (Schilder *et al.*, 1985) und die Keilwirkung auf die Wurzel ist geringer als bei der Technik der lateralen Kompaktion (Blum *et al.*, 1998). Auch die neben den Austrittspforten des Wurzelkanalsystems teilweise auftretenden Schilder-Puffs haben keine negativen Folgen auf den Heilungserfolg (Forgione, 1986).

Eine weitere Möglichkeit zur Füllung der Wurzelkanäle stellt das Thermafil-System dar. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der das Guttapercha heiß und mit Hilfe eines Trägers in den Wurzelkanal eingebracht wird (Baumann, 2005). Zunächst wird die Weite der Wurzelkanalaufbereitung mit einem Verifier ermittelt. Der Durchmesser des Thermafil-Stiftes sollte dem der Masterfeile im apikalen Bereich entsprechen und 0,5-1 mm kürzer als die Arbeitslänge sein (Cantatore,

2006). Eine Sealerverwendung ist auch in dieser Technik obligat. Mit Hilfe eines Ofens wird der Thermafil-Stift schnell und kontrolliert erhitzt. Daraufhin muss dieser innerhalb von 10 Sekunden in den Wurzelkanal eingebracht werden (Levitan *et al.*, 2003). Anschließend kürzt man den Stift mit einem Therma Cut. Die Thermafil-Methode ist eine schnelle, zuverlässige und gute Füllmethode sofern der Behandler geübt ist (Baumann, 2005). Zudem belegen verschiedene Studien eine im Vergleich zur lateralen Kompaktion gleichwertige bis sogar überlegene Dichtigkeit der Wurzelkanalfüllung (Guigand *et al.*, 2005; Pommel und Camps, 2001).

1.1.5 Ursachen für Misserfolge

Mit verschiedenen Ursachen, die zum Erfolg oder Misserfolg einer endodontischen Therapie führen, befasste sich unter anderem die im Jahr 1994 veröffentlichte Washington-Studie, an der 3678 Patienten teilnahmen (Ingle *et al.*, 1994). Die Erfolgsrate der endodontischen Behandlungen wurde hier mit 95% angegeben und betrug nach fünf Jahren noch rund 93%. Eine weitere Studie ermittelte die Ergebnisse der endodontischen Behandlung von 1.462.936 Zähnen und gab an, dass 8 Jahre nach einer nicht-chirurgischen endodontischen Behandlung 97% der Zähne in situ waren (Salehrabi und Rotstein, 2004).

Die Gründe für den Misserfolg einer endodontischen Behandlung sind vielfältig. Der Füllungsgrad eines Wurzelkanals spielt dabei eine wesentliche Rolle. Wird der Wurzelkanal mit einem Abstand von 0-2 mm vor dem röntgenologischen Apex gefüllt, liegt die Erfolgsrate bei 94%, ist der Abstand dagegen größer als 2 mm oder wird der Wurzelkanal überfüllt sind nur Erfolgsraten von 68% beziehungsweise 76% erzielt worden (Sjogren *et al.*, 1990). In der Washington-Studie wird des Weiteren angegeben, dass 14% der Misserfolge durch Behandlungsfehler, wie Instrumentenabbruch, Wurzelperforationen oder einer Via falsa, und 58% der nicht erfolgreichen Behandlungen durch unvollständige Wurzelkanalfüllungen bedingt sind (Ingle *et al.*, 1994). Eine wesentliche Rolle spielt auch die Versorgung des Zahnes nach einer Wurzelkanalbehandlung mit einer vollständigen und dichten koronalen Restauration (Salehrabi und Rotstein, 2004). Eine sehr wichtige Ursache für den Misserfolg einer endodontischen

Therapie ist aber die Persistenz pathogener Keime im Wurzelkanalsystem oder der apikalen Region und das Auftreten resistenter Spezies (Lin *et al.*, 1992).

1.2 Sealer

Ein wichtiges Ziel von Wurzelkanalbehandlungen ist es, eine randständige und dichte Füllung der Wurzelkanäle zu erreichen (Gatewood, 2007). Dazu wird in den verschiedenen Techniken der Wurzelkanalfüllung zusätzlich zum Kernmaterial, bei dem es sich meist um Guttapercha handelt, ein Sealer verwendet. Die Hauptfunktion eines Sealers besteht darin, die Lücken und Unregelmäßigkeiten zwischen den Guttaperchastiften und den Dentinwänden, bezogen auf die Technik der lateralen Kompaktion aber auch zwischen den einzelnen Guttaperchastiften selbst, zu füllen.

1.2.1 Grundsätzliche Anforderungen an Sealer

Ein wichtiges Kriterium ist das Erreichen eines dichten Verschlusses des Wurzelkanals. Inadäquate Wurzelfüllungen führen zu einem Eindringen von Bakterien oder Gewebeflüssigkeiten und können als Folge eine periapikale inflammatorische Reaktion induzieren (Ruddle, 2003). Deshalb muss der Sealer nach dem Ende der Aushärtezeit unlöslich sein und gleichzeitig einen starken Verbund zum Kernmaterial als auch zu den Dentinwänden herstellen.

Ein radioopakes Verhalten ist eine weitere Anforderung, die für den klinischen Alltag eine entscheidende Rolle spielt, um im Kontrollröntgenbild die Homogenität und Randständigkeit der Wurzelkanalfüllung beurteilen zu können. Die Radioopazität eines Sealers kann grundsätzlich durch den Zusatz von Metallsalzen wie beispielsweise Bariumsulfat erreicht werden (Gatewood, 2007).

Des Weiteren sollte ein Sealer während der Aushärtung keine Schrumpfung aufweisen, sondern idealerweise leicht expandieren, um die Entstehung von Lücken an der Grenzfläche von Guttaperchastiften zur Dentinoberfläche zu verhindern, wodurch kein dauerhafter und bakteriendichter Verschluss des Wurzelkanalsystems gewährleistet wäre. Die Expansion darf jedoch nur geringfügig sein, damit es nicht zu postoperativen Schmerzen oder vertikalen Wurzelfrakturen kommt (Veeramachaneni *et al.*, 2011).

Damit ein Sealer das apikale Foramen, Unregelmäßigkeiten in den Wurzelkanalwänden und akzessorische Dentinkanälchen erreichen und versiegeln kann, muss dieser eine ausreichende Fließfähigkeit besitzen. Diese darf aber wiederum auch nicht zu groß sein, um das Fließen des Materials über den Apex hinaus zu vermeiden. Die Fließfähigkeit hängt von verschiedensten Faktoren wie der Partikelgröße des Seales, der auftretenden Schubspannung, der Temperatur und der Dauer seit dem Anmischbeginn ab (Shalin Desai *et al.*, 2009).

Verfärbungen des Zahns nach endodontischen Behandlungen bedingt durch den Einsatz der Sealer sind vor allem im Frontzahnbereich ein alltägliches ästhetisches Problem. Eine wichtige Anforderung, die demnach heutzutage an den Sealer gestellt wird, ist keine Verfärbungen des Zahnes auszulösen. Jedoch zeigt eine Studie, dass alle der untersuchten Sealer Dentinverfärbungen auslösen können (Partovi *et al.*, 2006).

Darüber hinaus wird von Sealern erwartet, einen bakteriostatischen Effekt aufzuweisen oder zumindest das bakterielle Wachstum nicht zu fördern. Dazu werden den Sealern antimikrobielle Komponenten hinzugefügt, die vor allem das Wachstum residualer Bakterien und die bakterielle Invasion verhindern sollen. Hier ist sowohl Calciumhydroxid als auch Eugenol zu nennen (Weckwerth *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

Die negative Folge einer zunehmenden antibakteriellen Wirkung zeigt sich jedoch in der Zunahme der Toxizität des Sealers gegenüber dem umliegenden Gewebe (Shalin Desai *et al.*, 2009).

Vor allem für den klinischen alltäglichen Gebrauch spielt eine einfache Handhabung und eine ausreichende Verarbeitungszeit des Sealers eine wesentliche Rolle. Ein-Komponenten-Materialien oder Sealer, die mit Hilfe eines Automix-Systems angemischt werden können, sind solchen vorzuziehen, die manuell angemischt werden müssen, denn hier resultieren gewöhnlich Ungenauigkeiten im Mischungsverhältnis. Die Verarbeitungszeit des Sealers sollte ausreichend lang sein, damit bei der Durchführung der Wurzelkanalfüllung in der Standardtechnik, der lateralen Kompaktion, die Möglichkeit besteht mit Hilfe eines Spreaders mehrmals zusätzlichen Platz für weitere akzessorische Guttaperchastifte zu schaffen und somit eine randständige und dichte

Wurzelkanalfüllung zu erzielen (Gatewood, 2007). Ein langsamer Abbindevorgang soll zudem gewährleisten, dass der Sealer genug Zeit hat, in die Seitenkanäle zu fließen und Inkongruenzen auszufüllen (Desai *et al.*, 2009).

Eine unzureichende Präparation und Füllung der Wurzelkanäle kann in einer periapikalen Entzündung oder einer persistierenden Infektion resultieren. Für die Durchführung einer erfolgreichen Revisionsbehandlung, in der das noch vorhandene nekrotische Gewebe und residuale Bakterien beseitigt werden sollen, ist die Entfernbarekeit der Füllungsmaterialien aus dem Wurzelkanalsystem eine wichtige Voraussetzung. Demnach ist die vollständige mechanische oder chemischen Entfernbarekeit eines Sealers aus dem Wurzelkanalsystem eine weitere entscheidende Anforderung an diesen (Eldeniz *et al.*, 2007).

Einen weiteren wesentlichen Gesichtspunkt stellt die notwendige Gewebeverträglichkeit der Sealer dar. Denn da sich dieser in großer Nähe zum umgebenden vitalen Gewebe befindet, besteht die Gefahr, dass bereits während der Wurzelkanalbehandlung ein Teil des Sealers über das Foramen apikale in das periapikale Gewebe gelangt oder über längere Zeit hinweg auswaschbare Anteile und Abbauprodukte des Sealers über beispielsweise akzessorische Kanäle oder Dentintubuli aus dem Wurzelkanalsystem austreten können (Kim und Shin, 2014). Ist dies der Fall, kann es bei unzureichender Biokompatibilität zu lokalen Nebenwirkungen, wie beispielsweise einer verzögerten Wundheilung und einer Degeneration des umliegenden Gewebes, oder sogar zu systemischen Nebenwirkungen kommen (Eldeniz *et al.*, 2007). Aus diesen Gründen hängt der klinische Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung in entscheidendem Maße von der Biokompatibilität des verwendeten Sealers ab, die jedoch momentan unter den sich auf dem Markt befindlichen Produkten erheblich variiert. Denn eine Mehrzahl der Sealer übt im frischen Zustand eine gewisse Zytotoxizität aus, die in der Regel ab dem Zeitpunkt der Sealerapplikation durch die sinkende Konzentration an herauslösbaren Komponenten abnimmt (Eldeniz *et al.*, 2007).

Wünschenswert ist es darüber hinaus, dass ein Sealer antiinflammatorische Eigenschaften ausweist, sodass die Entzündung im Wurzelkanalsystem und im apikalen Parodontium gemildert werden kann. Dazu muss der Sealer Wirkstoffe enthalten die auf molekularer Ebene in den Entzündungsprozess eingreifen

können. Diese Fähigkeit wird beispielsweise dem Eugenol zugeschrieben (Markowitz *et al.*, 1992). Jedoch wurde einer Vielzahl von Sealer in mehreren Studien das genaue Gegenteil zugeschrieben. Laut diesen Studien lösen Sealer häufig eine leichte bis starke entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes aus (Huang *et al.*, 2005). Unter anderem spielen der inflammatorische Mediator PGE₂, die Cyclooxygenase-2, genauso wie verschiedene Interleukine eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Progression der Entzündung (Coon *et al.*, 2007).

Für die optimale Heilung des periapikalen Gewebes und damit den Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung ist es entscheidend, dass es zu einer Regeneration des umliegenden Knochens kommt. Idealerweise besitzt ein Sealer die Eigenschaft diese Regeneration durch die Anregung der Stammzellen zur Differenzierung zu Osteoblasten zu fördern (Huang *et al.*, 2002).

1.2.2 Klassifizierung von Sealern

Grundsätzlich lassen sich Sealer nach ihrer Zusammensetzung in verschiedene Gruppen einteilen. Dabei unterscheidet man zinkoxideugenolfreie von zinkoxidbasierenden Sealern.

1.2.2.1 Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis

Die bedeutendsten Vertreter der Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis sind Pulp Canal Sealer und Tubliseal (Kerr, Bioggio, Schweiz). Diese Sealer waren eine lange Zeit Standard in der Endodontie. Angeboten werden diese Sealer als Zwei-Komponenten-Materialien in Form von Pulver-Flüssigkeit- oder Paste-Paste-Systemen mit einer ausreichend langen Verarbeitungszeit. Selbst nach sachgerechtem Anmischen der Komponenten bildet sich ein wenig widerstandsfähiges, poröses Zinkeugenolat, das in Gewebeflüssigkeiten löslich ist und deshalb nur in Kombination mit einem geeigneten Kernmaterial verwendet werden darf (Wilson *et al.*, 1973). Bei korrekter Anwendung zeigen diese Sealer jedoch gute klinische Ergebnisse im Sinne eines dauerhaft randständig verschlossenen Kanals, die auf die starke Adhäsion an das Dentin mit einer guten Abdichtung, einer geringen Schrumpfung und die antibakteriellen Eigenschaften zurückzuführen sind (Gatewood, 2007). Problematisch sind jedoch die durch das

Eugenol bedingten zytotoxischen und allergisierenden Eigenschaften dieser Sealer (Huang *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2008). Gelangen Wurzelfüllpasten auf Zinkoxid-Eugenol-Basis in das periradikuläre Gewebe kommt es durch die temporäre toxische Wirkung des Eugenols zu einer negativen Beeinflussung des Heilungsverlaufs, sowie zur Ausbildung von Nekrosen des Knochens und des Desmodonts (Leonardo *et al.*, 1999). Zudem kann es durch die Verwendung von zinkoxid-eugenol-basierenden Sealern zur Entstehung einer Aspergillose im Sinus maxillaris kommen, wenn das Wurzelfüllmaterial über den Apex verpresst wird (Giardino *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Sealer auf Epoxidharzbasis

Epoxidharzsealer sind seit über 50 Jahren in Form von AH 26 und dessen Folgeprodukt AH plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland) in der Endodontie etabliert. Bereits im Jahr 1957 stellte Prof. A. Schröder in den Vereinigten Staaten den epoxidharzbasierenden Sealer AH 26 vor (Cohen *et al.*, 2000).

AH plus und AH 26 werden als Zwei-Komponenten-Systeme vertrieben. AH 26 besteht aus einem Pulver-Flüssigkeitssystem, das manuell angemischt werden muss, während AH plus in einem Automix-System angeboten wird, wodurch ein kontrolliertes Anmischen und ein stets gleiches und homogenes Mischverhältnis erreicht wird. AH 26 weist bereits sehr gute physikalische und materialtechnische Eigenschaften auf, die bei seinem Folgeprodukt AH plus in vielen Aspekten nochmals verbessert werden konnten. Nach dem Anmischen von AH plus tritt eine geringere Schrumpfung auf als bei AH 26, da AH plus durch eine Epoxid-Amin-Additionspolymerisation härtet und nicht - wie AH 26 - kondensationsvernetzt ist (Rödig *et al.*, 2005).

Zudem wird von AH plus und AH 26 eine sehr gute Adhäsion an der Wurzelkanalwand erreicht, die einer bakteriellen Penetration entgegenwirkt (Cohen *et al.*, 2000). Im Vergleich mit anderen konventionellen Sealern konnten AH plus und AH 26 dabei die höchsten Haftwerte erreichen (Lee *et al.*, 2002; Eldeniz *et al.*, 2005). Des Weiteren ist AH plus bei der Beurteilung des Abdichtungsverhaltens anderen Sealern überlegen (De Moor und De Bruyne, 2004), weist eine geringe Löslichkeit und eine ausgezeichnete Fließfähigkeit auf

(Miletic *et al.*, 2005). Ferner besitzen AH 26 und AH plus durch den Zusatz von Calciumwolframat und Zirkoniumoxid auch in geringen Schichtstärken eine ausreichende Radioopazität (Gatewood, 2007; Gorduysus und Avcu, 2009). Vorteilhaft ist außerdem, dass sich AH plus aufgrund der ausreichend langen Verarbeitungszeit und der hohen thermischen Stabilität von bis zu 250 °C für alle Obturationstechniken eignet (Roggendorf, 2006).

Problematisch bezüglich der Verwendung von AH 26 ist die in vielen in-vitro und in-vivo Studien belegte Zytotoxizität und Genotoxizität. So wurde beispielsweise in einer 2002 veröffentlichten Studie ein konzentrationsabhängiger Anstieg der zytotoxischen Effekte auf Astrozyten und die Schädigung deren DNA (Desoxyribonukleinsäure) durch AH 26 nachgewiesen (Huang *et al.*, 2002). Diese negative Eigenschaft wird vor allem der Freisetzung von Formaldehyd zugeschrieben (Spangberg *et al.*, 1993; Koulaouzidou *et al.*, 1998). Denn durch das Anmischen kommt es während der Abbindereaktion im sauren Milieu zum Zerfall von im Pulver enthaltenen Hexamethylentetramin in Ammoniak und Formaldehyd (Athanasiadis *et al.*, 2014). Jedoch ist nicht bestätigt, dass nur dieser einzelne Bestandteil und nicht auch weitere Komponenten für die Zytotoxizität von AH 26 verantwortlich ist. So machen Schweikl und Mitarbeiter nicht die Formaldehydfreisetzung, sondern den in der flüssigen Komponente enthaltenen Bisphenol-A-diglycidylether für die starke Zytotoxizität verantwortlich (Schweikl *et al.*, 1995). Als Konsequenz dieser Zytotoxizität von AH 26, wurde AH plus entwickelt, das heute einer der meist untersuchtesten Sealer ist. AH plus besteht zum einen aus dem Hauptbestandteil Epoxidharz Araldit, zum anderen aus dem Aminobaustein Amino-Adamantan und einem sekundären Diamin. Es enthält kein Hexamethylentetramin und setzt laut dem Hersteller kein Formaldehyd frei. Jedoch belegen auch hier verschiedene in vitro- Studien und klinische Studienergebnisse eine hohe initiale und konzentrationsabhängige Zytotoxizität von AH plus mit einer starken Abnahme mit zunehmender Zeit (Camargo *et al.*, 2014; Pinna *et al.*, 2008), welche aber ein geringeres Ausmaß als die von AH 26 aufweist und somit AH plus als mehr biokompatibel aufzeigt. Camargo und Mitarbeiter untersuchten die Zytotoxizität von AH plus mit Hilfe eines MTT-Assays (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) an chinesischen Hamster Fibroblasten (V79), während Pinna und Mitarbeiter die

Untersuchungen an Osteosarkom Zellen der Ratten durchführten. Diese Zytotoxizität kann einerseits auf ein Minimum an Formaldehydfreisetzung aus Aminen, die die Polymerisation beschleunigen, zurückgeführt werden. Denn in einer Studie konnte die Formaldehydfreisetzung von AH plus und AH 26 nachgewiesen werden. Dabei lag die freigesetzte Menge bei AH plus bei 3,9 ppm, während bei AH 26 1347 ppm gemessen wurden (Cohen *et al.*, 1998). Andererseits kann auch hier wiederum der Bestandteil Bisphenol-A-diglycidylether die Zytotoxizität bedingen. Zu erwähnen ist außerdem, dass wenige Studien nicht mit den genannten Ergebnissen übereinstimmen und AH plus keine bis nur eine sehr geringe initiale Zytotoxizität bescheinigen (Karapinar-Kazandag *et al.*, 2011). Die Untersuchungen wurden an L929 Maus Fibroblasten und primären menschlichen Pulpazellen mit einem MTS-Assay durchgeführt. Zusammenfassend kann nach der wissenschaftlichen Stellungnahme der DGZMK angeführt werden, dass AH plus momentan als Goldstandard unter den auf dem Markt verfügbaren Sealern gilt (DGZMK, 2000).

1.2.2.3 Sealer auf Salicylat-Basis mit Kalziumhydroxid

Apexit (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) und Sealapex (Kerr, Karlsruhe Deutschland) sind zwei bekannte Vertreter der Sealer auf Salicylat-Basis mit Kalziumhydroxid. Kalziumhydroxid wird seit langem in der Zahnheilkunde eingesetzt. Indikationen sind unter anderem die direkte Überkappung, die Apexifikation aber auch der Einsatz als medikamentöse Einlage. Zur Verwendung kommt es vor allem aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaft und der Potenz die Hartgewebsneubildung zu fördern. Voraussetzung ist dabei die Dissoziation des Kalziumhydroxids zu Kalzium und Hydroxylionen, denn nur dann können die Hydroxylionen den pH-Wert erhöhen und somit antibakteriell wirken und das Kalzium die Mineralisation fördern (Hosoya *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Fähigkeiten wurde Kalziumhydroxid auch als Inhaltsstoff von Sealern etabliert. Bis heute liegen jedoch keine Studien vor, die belegen können, dass diese positiven Effekte von kalziumhydroxylhaltigen Präparaten zur direkten Überkappung auch von kalziumhydroxylhaltigen Sealern erfüllt werden (Gatewood, 2007) und diese nur geringe oder keine antibakterielle Aktivität zeigen. Die Ursache dafür liegt möglicherweise in der insuffizienten pH-Wert Erhöhung, der begrenzten

Löslichkeit und der limitierten Diffusion des Kalziumhydroxids in die Dentintubuli (Desai *et al.*, 2009).

Bezüglich der physikalischen Eigenschaften unterscheiden sich Sealapex und Apexit in bestimmten Aspekten. Sealapex hat eine Abbindezeit von zwei bis drei Wochen und härtet in einem trockenen Umfeld nicht (Allan *et al.*, 2001), während Apexit in weniger als zwei Stunden aushärtet (McMichen *et al.*, 2003). Bezüglich der Dimensionsstabilität wurde für Sealapex eine Expansion belegt, wohingegen Apexit sehr geringe Dimensionsänderungen (0,4%) aufweist (Salz *et al.*, 2009). Des Weiteren weist Sealapex eine hohe Löslichkeit im Speichel und in Gewebeflüssigkeiten auf, die zu Randundichtigkeiten führen können (Wu *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wird Apexit nicht durch Flüssigkeiten gelöst und garantiert somit eine langfristige Abdichtung. Ob es durch Sealapex und Apexit zu Verfärbungen kommen kann, ist durch Studien nicht ausreichend belegt. Die Radioopazität dieser Sealer ist im Vergleich zu AH plus sehr gering und damit im klinischen Alltag nachteilig. In einer vergleichenden Studie entspricht die Radioopazität von AH plus einem 16 mm dicken, während die von Sealapex nur einem 2 mm dicken Aluminium Block entspricht und damit unter der nach ISO 6876/2001 geforderten Grenze von 3 mm liegt (Desai *et al.*, 2009).

Die Zytotoxizität dieser Sealer wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Ergebnisse teilweise widersprechen (Gomes-Filho *et al.*, 2009; Scelza *et al.*, 2012). Grundsätzlich zeigten Sealapex und Apexit im Vergleich mit zinkoxideugenol-basierenden und epoxidharzbasierenden Sealern in Zellkulturversuchen mit hPDL- oder Mauszellen jedoch eine geringere Zytotoxizität (Desai *et al.*, 2009).

Zusammenfassend betrachtet erfüllen die Sealer auf Salicylatbasis mit Kalziumhydroxid nicht alle genannten Anforderungen. Jedoch zeichnen sie sich durch ihre sehr gute Biokompatibilität aus. Da bestimmte Sealer dieser Gruppe eine hohe Löslichkeit aufweisen, können diese momentan nur mit Zurückhaltung empfohlen werden (DGZMK, 2000).

1.3 Reparatur-Materialien

5,5% aller durchgeführten endodontischen Behandlungen umfassen retrograde Wurzelkanalfüllungen und Reparaturen von Wurzelkanalperforationen (Testori *et al.*, 1999). Für diesen Zweck wurden in der Vergangenheit verschiedenste Materialien, wie beispielsweise Amalgam, Zinkoxid-Eugenol-Zemente oder Glasionomerezemente vorgeschlagen. Jedoch hat sich keines der genannten Materialien klinisch bewährt (Bodrumlu, 2008). Denn ein ideales Reparaturmaterial erfüllt alle Anforderungen, die auch an Sealer gestellt werden, wie etwa Dichtigkeit, Biokompatibilität, sowie eine einfache Handhabung. Darüber hinaus wird von diesen gefordert, dass sie von Blut und Kontamination nicht beeinflusst werden, eine Aushärtung im feuchten Milieu stattfindet und ein bioaktives Potential gegeben ist (Bonson *et al.*, 2004). Verschiedene Vertreter aus der Gruppe der hydraulischen Silikatzemente weisen bereits viele der geforderten Eigenschaften auf und konnten sich deshalb in den letzten Jahren weitgehend durchsetzen.

1.3.1 Hydraulische Silikatzemente

In der Endodontie werden heute verschiedene hydraulische Silikatzemente wie beispielsweise ProRootMTA oder Medcem MTA verwendet.

1.3.1.1 ProRootMTA

Mineral Trioxid Aggregat (MTA) ist ein Derivat aus der Gruppe der hydraulischen Silikatzemente, das an der Universität Loma Linda in Kalifornien von Mahmoud Torabinejad und Pitt Ford als Verschlussmaterial für retrograde Wurzelfüllungen und Perforationen entwickelt wurde. Im Jahr 1993 wurde die erste wissenschaftliche Studie über ProRootMTA (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland) veröffentlicht (Lee *et al.*, 1993). Nachdem sich in den letzten Jahren der Anwendungsbereich des MTAs in der Zahnmedizin vergrößert hat, kann ProRootMTA heute für verschiedenste Indikationen verwendet werden. Es dient zum Verschluss von Perforationen, die iatrogen oder infolge einer internen Resorption auftreten können und als retrogrades Wurzelfüllmaterial. Des Weiteren kann es für die Überkappung der Pulpa und zur Apexifikation genutzt werden (Camilleri und Pitt Ford, 2006; Roberts *et al.*, 2008). Ursprünglich war ProRootMTA in der grauen Farbe erhältlich. Aufgrund der Verfärbungstendenz der

Zahnkronen, wurde 2002 die weiße Variante eingeführt. Der Hauptunterschied ist, dass im grauen MTA farbgebende Eisenverbindungen enthalten sind, welche beim weißen MTA fehlen (Asgary *et al.*, 2005). Weißes ProRootMTA besteht zu 75% aus Portland Zement und weist einen hohen Bismuth-Oxid-Anteil (20%) auf. Weitere Inhaltsstoffe sind Tricalcium-Silikat, Dicalcium-Silikat, Tricalcium Aluminat und Calciumsulfatdehydrogenat. Bismuthoxid dient der Steigerung der Radioopazität (Laghios *et al.*, 2000). ProRootMTA ist ein Pulver, das mit destilliertem Wasser im Verhältnis 3:1 angemischt wird. Das Pulver besteht aus feinen hydrophilen Partikeln, die sich durch Wasseraufnahme innerhalb von 2,5-3 Stunden zu einem kolloidartigen Gel verfestigen (Lee *et al.*, 1993). Dieses Gel bildet laut Hersteller eine feste und undurchlässige Barriere. Nach Anmischen des MTAs kann ein Anstieg des pH-Wertes beobachtet werden, welcher in der Literatur mit Werten zwischen 9,22 (Duarte *et al.*, 2003) und 12,5 (Torabinejad *et al.*, 1995) angegeben wird. Dieser Anstieg ist auf die Umwandlung des Kalziumoxids unter dem Einfluss von Gewebeflüssigkeiten in Kalziumhydroxid zurückzuführen, welches wiederum in Kalzium- und Hydroxylionen zerfällt (Takita *et al.*, 2006). Als Folge des pH-Wert Anstiegs und der Freisetzung der genannten Ionen zeigt MTA eine gute antimikrobielle Wirkung.

Weitere Faktoren, die in verschiedenen Studien insgesamt eine gute Biokompatibilität von MTA ergaben, sind eine nicht vorhandene Genotoxizität und eine ebenso geringe bis nicht nachweisbare Zytotoxizität (Ribeiro *et al.*, 2006; Osorio *et al.*, 1998). Darüber hinaus stimuliert MTA die Bildung von mineralisiertem Gewebe (Yaltirik *et al.*, 2004) und unterstützt die Regeneration des parodontalen Ligaments (Schwartz *et al.*, 1999). In Studien über die Verwendung von MTA als retrogrades Wurzelfüllmaterial konnte zudem eine Zementneubildung nachgewiesen werden (Torabinejad *et al.*, 2009). Eine während der Aushärtung auftretende Expansion, die zu einer verstärkten Adaptation an das Dentin führt und somit die Dichtigkeit erhöht, ist eine weitere wichtige Eigenschaft von ProRootMTA (Srinivasan *et al.*, 2009).

Den genannten positiven Eigenschaften sind einige Nachteile gegenüberzustellen. Zum einen sind die Kosten im Vergleich zu anderen Materialien mit etwa 140 € für 1 g sehr hoch, zum anderen ist die Lagerung problematisch. ProRootMTA muss

luftdicht und wassergeschützt gelagert werden und eine Packung, die eigentlich für mehrere Anwendungen ausreicht, hat nur eine kurze Haltbarkeit (Srinivasan *et al.*, 2009). Ein weiterer Nachteil ist die lange Aushärtedauer von MTA, welche für das weiße ProRootMTA bei circa 250 Minuten liegt (Gandolfi *et al.*, 2015). Dadurch ist das Risiko, dass das MTA ausgewaschen wird, vor allem bei retrograden Wurzelkanalfüllungen sehr hoch (Prati und Gandolfi, 2015). Zudem muss ProRootMTA von Hand angemischt werden, sodass das Erreichen der richtigen Konsistenz schwierig ist. Dieser Aspekt stellt einen wesentlichen Nachteil in der Handhabung dar (Ber *et al.*, 2007).

1.3.1.2 MedCem MTA

Im Jahr 2012 wurde das MedCem MTA (MedCem GmbH, Weinfelden, Schweiz) als Folgeprodukt des medizinischen Portland Zements in den Markt eingeführt. Die beiden Materialien sind in ihrer Zusammensetzung bis auf das Zirkoniumdioxid identisch, das bei MedCem MTA eine höhere Röntgenopazität gewährleistet. MedCem MTA stellt eine Alternative zu ProRootMTA dar. Die chemische Zusammensetzung der beiden Materialien ist vergleichbar, jedoch enthält ProRootMTA zur Erhöhung der Radioopazität 2% Bismuthoxid, welches im MedCem MTA fehlt (Camilleri *et al.*, 2005; Funteas *et al.*, 2003). Laut Herstellerangaben eignet sich das MedCem MTA vor allem als Überkappungsmaterial für bleibende Zähne und Milchzähne. Außerdem soll er sich durch die Farbstabilität und die positiven bioinduktiven und mechanischen Eigenschaften auszeichnen. Ein besonders wichtiger Aspekt sind darüber hinaus die weit geringeren Kosten von MedCem MTA gegenüber ProRootMTA (Petrou *et al.*, 2014), wodurch dieser für die Zahnarztpraxen besonders attraktiv wird.

1.3.2 Bioaktive Kalzium-Silikat-Zemente

In neuerer Zeit sind auch einige Derivate von Portland-Zementen auf den Markt gekommen, darunter die sogenannten bioaktiven Kalzium-Silikat-Zemente. Wichtigster Vertreter dieser Gruppe, die die Bildung von Tertiärdentin fördern, ist das 2011 in den Markt eingeführte Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Frankreich), das heute eine Alternative zum ProRootMTA darstellt (Kenchappa *et al.*, 2015). Biodentine eignet sich für ein großes Spektrum an klinischen

Indikationen. Die Behandlung von Perforationen im Wurzelkanalsystem und im Pulpakammerboden, ist ebenso wie die Behandlung interner und externer Resorptionen möglich. Darüber hinaus dient es als retrogrades Wurzelfüllmaterial, zur Pulpa-Überkappung und Pulpotomie sowie zur Apexifikation. Auch für den temporären Verschluss von Kavitäten zervikaler Füllungen kann es genutzt werden (Kaup *et al.*, 2015).

Biodentine zeichnet sich durch seine mit ProRootMTA vergleichbare Biokompatibilität aus. Es weist keine Mutagenität auf, beeinflusst die spezifische Funktion der Zielzellen nicht (Mori *et al.*, 2014), und fördert außerdem die Regression von Entzündungsreaktionen (da Fonseca *et al.*, 2015). Die hohe Dichtigkeit des Materials wird durch die alkalische Ätzung des Dentins, das 10-20 µm tiefe Eindringen in die Dentintubuli und die adhäsiven Eigenschaften des Biodentins erreicht (Jeevani *et al.*, 2014). Des Weiteren zeichnet sich Biodentine gegenüber ProRootMTA in der vergleichsweise einfacheren Handhabung und einer kürzeren initialen Abbindezeit von 6,5 Minuten aus (Butt *et al.*, 2014). Als bedeutendste positive Eigenschaft von Biodentine ist jedoch das bioaktive Potential zu nennen. In einer 2015 veröffentlichten Studie wurde die Bildung von Tertiärdentin unter dem Einfluss von Biodentine an bleibenden Schweineezähnen nachgewiesen (Tziafa *et al.*, 2015). In einer weiteren Studie wurden die Effekte von Biodentine auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten untersucht. Hier wurde eine erhöhte Expression von Osteocalcin, alkalische Phosphatase und Knochen-Sialoprotein in den durch Biodentine beeinflussten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen (Lee *et al.*, 2014). Ein wesentlicher Nachteil des Biodentins ist die nicht ausreichende Röntgensichtbarkeit, die mit der des Dentins vergleichbar ist und somit eine Unterscheidung von Zahnhartsubstanz und Wurzelfüllung unmöglich macht. (Kaup *et al.*, 2015).

1.4 Total Fill BC Sealer (Total Fill BCS)

Im Jahr 2009 wurde in den USA ein neues Material mit dem Namen Endosequence BC Sealer (Brasseler, Savannah, GA, USA) eingeführt. Dieser Sealer wird in Kanada und der Schweiz als iRoot SP (BioCreamix Inc, Vancouver, Kanada) vertrieben und ist seit Ende 2013 auf dem deutschen Markt unter dem

Namen TotalFill BC Sealer (FGK, American Dental Systems) erhältlich. Es handelt sich dabei laut Hersteller um eine biokeramische Zementpaste, die folgende Inhaltsstoffe besitzt: Zirkoniumoxid, Trikalziumsilikat, Dikalziumsilikat, monobasisches Kalziumphosphat und Kalziumhydroxid sowie Füll- und Verdickungsstoffe. Damit ist es in seiner Zusammensetzung mit ProRootMTA und Biodentine vergleichbar und ebenfalls der Übergruppe der hydraulischen Silikatzemente zuzurechnen. Der permanente Verschluss des Wurzelkanals sowohl im Anschluss an eine Vitalexstirpation, als auch nach Entfernung der infizierten oder nekrotischen Pulpa mit Einlegen einer medikamentösen Einlage, werden von Brasseler als Anwendungsbereiche des TotalFill BC Sealers angegeben.

Eine vorhandene Restfeuchtigkeit in den Dentintubuli löst die Abbindereaktion des BCS aus und unterhält diese (Loushine *et al.*, 2011). Die Abbindezeit wird vom Hersteller mit 4 Stunden beziehungsweise in sehr trockenen Kanälen mit bis zu 10 Stunden angegeben. Diese Angaben bestätigte eine 2013 veröffentlichte Studie (Zhou *et al.*, 2013). In einer weiteren Studie wurden jedoch eine Dauer von 168 Stunden bis zur endgültigen Härtung gemessen (Loushine *et al.*, 2011). Da sich der Sealer vorgemischt in einer Spritze befindet, ist er leicht zu handhaben und es besteht keine Gefahr von Mischungsinhomogenitäten. Sowohl in seinen physikalisch-chemischen, als auch den biologischen Eigenschaften weist der BCS Sealer vor allem Vorzüge auf, jedoch gibt es bis heute nur wenige unabhängige Studien dazu. Die Radioopazität des BC Sealers ist zwar mit 3,84 mm Al deutlich geringer als die von AH plus (6,90 mm Al), entspricht aber genauso wie die Fließfähigkeit den Empfehlungen der ISO 6876/2001 (Candeiro *et al.*, 2012; International Organisation of Standardization ISO 6876). Zähne, deren Wurzelkanäle mit BC Sealer gefüllt wurden, weisen im Vergleich mit AH plus bezüglich der Bruchfestigkeit höhere Werte auf (Hegde und Arora, 2015). Faktoren dafür sind einerseits die chemische Bindung von BC Sealer an die Dentin Wände (Skidmore *et al.*, 2006), andererseits möglicherweise die im Sealer enthaltenen Nanopartikel, welche tief in die Dentintubuli und Unregelmäßigkeiten der Kanalwände eindringen können (Ghoneim *et al.*, 2011). Während der Aushärtung kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes, der zu allen gemessenen Zeiten deutlich im alkalischen Bereich liegt (Zhou *et al.*, 2013). Jedoch stimmen

die Maximalwerte mit 11,21 nach 168 Stunden nicht mit den Angaben des Herstellers von 12,8 überein (Candeiro *et al.*, 2012). Des Weiteren setzt der BC Sealer während der Abbindereaktion Kalziumionen frei, bildet kalzium- und phosphatreiche Oberflächenpräzipitate und bewirkt die Aufnahme von Kalzium und Silikat in menschliche Dentintubuli. Besondere biologische Bedeutung hat die Einlagerung von Silikat, da dieses mit einer Steigerung der Rate der Knochenneubildung assoziiert ist (Patel *et al.*, 2003) und die Remineralisation von demineralisiertem Dentin induziert (Saito *et al.*, 2003). Zu beachten ist aber, dass die genannten Eigenschaften des BC Sealers von ProRootMTA und Biodentine übertroffen werden, denn diese setzen höher Mengen Kalzium frei und auch die Tiefe der Einlagerungen von Kalzium und Silikat ins Dentin sind tiefer (Han und Okiji, 2013). Die antibakteriellen Effekte des BC Sealers wurden bis zuletzt kontrovers dargestellt. 2011 wurde eine Studie veröffentlicht, welche das Vorhandensein antibakterieller Effekte des BC Sealers gegenüber *Enterococcus faecalis* bestreitet (Willershausen *et al.*, 2011). Widersprüchlich dazu ist eine drei Jahre später erschienene Studie, welche genau diese Eigenschaft des BC Sealers bestätigt (Zhejun *et al.*, 2014). Bezüglich der Zytotoxizität des BC Sealer liegen bis heute kaum Studien mit übereinstimmenden Ergebnissen vor. Eine 2011 veröffentlichte Studie kam zu dem Ergebnis, dass der BC Sealer initial eine starke Zytotoxizität aufweist die bis zur 5. Woche nach dem Abbinden moderat ist, während AH plus bereits nach drei Wochen keine Zytotoxizität mehr aufweist (Loushine *et al.*, 2011). Die Ergebnisse aus einem MTT-Assay an Osteoblasten-ähnlichen Zellen mit Ursprung aus der Schädelkalotte der Maus (MC3T3-E1). Demgegenüber steht eine Studie, die dem BC Sealer eine geringere Zytotoxizität als AH plus bescheinigt und eine Zellüberlebensrate der Maus Fibroblasten von >90-100% in allen Eluatkonzentrationen feststellte (Zoufan *et al.*, 2011). Inwiefern der BC Sealer eine im Wurzelkanal vorhandene Entzündung positiv beeinflussen kann, wurde bis jetzt kaum untersucht.

1.5 Total Fill Root Repair Material (Total Fill RRM)

Zusätzlich zum Total Fill BC Sealer führte Brasseler (Savannah, GA, USA) ebenfalls im Jahr 2013 das Total Fill Root Repair Material in den deutschen Markt ein. Dieses Material ist in einer Spritze oder als Putty erhältlich. Laut dem

Hersteller soll es eine Alternative zu ProRootMTA darstellen. Im Vergleich zu ProRootMTA soll eine längere Verarbeitungszeit von bis zu 30 Minuten, eine kürzere Abbindezeit von mindestens zwei Stunden bei normalen Bedingungen und eine bessere Handhabung gewährleistet sein. Außerdem soll es laut Hersteller durch die hohe Biokompatibilität und die antibakterielle und osteoinduktive Wirkung zu einer hervorragenden Heilung kommen. Das Indikationsspektrum reicht von der Reparatur einer Wurzelperforation und einer Wurzelresorption über die Füllung einer Wurzelspitze bis hin zur Apexifikation und Pulpaüberkappung. Die Zusammensetzung ähnelt dem Total Fill BC Sealer. Jedoch enthält das Total Fill RRM kein Kalziumhydroxid, sondern stattdessen Tantalpentoxid. Die vom Hersteller angegebenen Eigenschaften des Materials wurden bis heute nur in wenigen veröffentlichten Studien überprüft. Eine im Jahr 2013 veröffentlichte Studie verglich die Aushärtedauer vom RRM mit der von MTA bei Anwesenheit von Blut und Medium. Das Ergebnis dieser Studie stellt einen Widerspruch zu der vom Hersteller angegebenen Abbindezeit dar. Denn selbst nach 48 Stunden konnte keine vollständige Aushärtung des RRM festgestellt werden (Charland *et al.*, 2013). Bezüglich des Abdichtungsvermögens des Total Fill RRM liegen zwei sich widersprechende Veröffentlichungen vor, die jeweils einen Vergleich mit ProRootMTA anstellen. Einerseits wurden gleich gute Abdichtungsfähigkeiten von RRM wie vom ProRootMTA festgestellt (Nair *et al.*, 2011), andererseits wurde die des ProRootMTA als überlegen angegeben (Hirschberg *et al.*, 2013). Die Biokompatibilität von Total Fill RRM wurde bereits in mehreren Studien durch Zytotoxizitätstests überprüft. Im Vergleich mit MTA zeigt das RRM in den meisten Untersuchungen ähnliche Zellviabilität, und somit eine hohe Biokompatibilität (Ma *et al.*, 2011; Damas *et al.*, 2011; Alanezi *et al.*, 2010). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einer Publikation, die eine signifikante Abnahme der Zellviabilität nach Exposition der untersuchten Zellen gegenüber Total Fill RRM zu allen Messzeitpunkten und jeder Konzentration der Eluate feststellte (Modareszadeh *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse basieren auf Untersuchungen an humanen Osteosarkom Zellen (Saos-2), deren Reaktion auf das RRM sowohl im MTT- als auch im Alkalische Phosphatase-Assay ermittelt wurde. Eine weitere besonders wichtige Anforderung an ein derartiges Material ist die Bioaktivität, welche bis jetzt nur in einer Veröffentlichung untersucht wurde. Es konnte eine Präzipitation von

kristallinen Apatitstrukturen sowohl an der Zementoberfläche, als auch an den Grenzflächen zwischen Zement und Dentin nachgewiesen werden, die mit der Zeit stark zunahm (Shokouhinejad *et al.*, 2012).

2 Ziel der Untersuchung

Die aktuelle Studienlage zeigt, dass es nicht selten zu Misserfolgen und unzureichenden Ergebnissen im Rahmen der endodontischen Behandlung kommt, welche teilweise auch auf die unzureichenden Eigenschaften der Sealer und Reparatur-Materialien zurückzuführen sind. Mit dem Ziel diese zu verbessern, kamen in den letzten Jahren zahlreiche Neuentwicklungen auf den Markt. Zwei Beispiele dafür aus der Gruppe der hydraulischen Silikatzemente sind der Total Fill BC Sealer und das Total Fill RRM. Da beide Materialien bis zuletzt nur in wenigen Studien untersucht wurden und die Ergebnisse teilweise kontrovers sind, ist es das Ziel dieser Arbeit, die beiden Materialien bezüglich dreier Gesichtspunkte genauer zu untersuchen und dabei mit dem klinisch bewährten epoxidharzbasierten Sealer AH plus zu vergleichen.

Zur Beurteilung des zytotoxischen und genotoxischen Potentials sollen WST-8-Tests, Caspase- und Mikronukleus-Assays durchgeführt werden. Des Weiteren soll der Einfluss der Sealer auf mögliche Entzündungsreaktionen im periapikalen Gewebe untersucht werden. Zu diesem Zweck werden einerseits ELISAs auf PGE₂ und IL-6, andererseits Western Blot Analysen der zytosolischen Proteine auf $\text{ikB}\alpha$ angewendet. Anhand von ELISAs auf Osteocalcin, Western Blot-Analysen der Zellkern-Proteine auf RUNX2 und immunzytochemischen Untersuchungen soll zudem eine mögliche Einflussnahme der zu untersuchenden Materialien auf das Regenerationsvermögen des umgebenden Gewebes untersucht werden.

3 Material und Methode

3.1 Zellarten und Zellkulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments (hPDLF) der Firma Lonza (Basel, Schweiz) verwendet. Dabei handelt es sich um primäre Zellen, die aus dem parodontalen Ligament von Molaren isoliert wurde. Die Zellen wurden negativ auf Bakterien, Viren, Pilze und Mykoplasmen getestet. Ebenfalls wurden von der Firma Lonza humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) bezogen. Diese Zellen wurden aus dem Knochenmark durch Beckenkammpunktion gewonnen und besitzen laut Hersteller die Fähigkeit chondrogen, osteogen und adipogen zu differenzieren. Zudem wurden humane Gingivafibroblasten (HGF-1) der Firma LGC-Promochem (Teddington, UK) benutzt, die aus der Gingiva isoliert wurden, und humane Osteoblasten (hOB), die von der PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen wurden. Diese Zellen wurden aus der trabekulären Knochenstruktur des Femurs oder der Hüftgelenksregion gewonnen. Außerdem wurden Versuche mit PDSC-hTERT-Zellen durchgeführt (Docheva *et al.*, 2010). Diese wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. D. Docheva, Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine immortalisierte Zelllinie von Progenitorzellen des parodontalen Ligaments. Diese Zellen produzieren in Folge einer osteogenen Stimulation Strukturen, die sowohl dem Knochen, als auch dem parodontalen Ligament ähnlich sind. Deshalb eignen sie sich für Versuche, die das osteogene Potential bestimmter, zur Anwendung im Bereich des parodontalen Ligaments bestimmter Substanzen untersuchen.

Die HGF-1-, die hPDLF-, und die hMSC-Zellen wurden in α -MEM-Medium (minimal essentielles Medium, gibco, life technologies, Carlsbad, CH, USA) kultiviert, während die PDSC-hTERT-Zellen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) high glucose (4,5 g/L) kultiviert wurden. Beiden Medien wurde jeweils 10% fetales Kälberserum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 U/ml Penicillin G und 100 μ g/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich) zugesetzt. Die hOB-Zellen wurden dagegen in hOB-

Medium (Osteoblast Growth Medium, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) kultiviert.

Die Bedingungen im Inkubator (HERAcell 150, Thermo Scientific, MA, USA) wurden konstant bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und bei 100% Luftfeuchtigkeit gehalten.

3.2 Routinemethoden in der Zellkultur

3.2.1 Zellen auftauen

Die Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofflagerbehälter im Wasserbad auf 37°C erwärmt und zentrifugiert (2 min, 300 g, Mikrofuge 18, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), um das für die Zellen toxische DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma) zu entfernen. Dieses wurde zugegeben, um während des Einfrierens eine intrazelluläre Eiskristallbildung zu verhindern. Im Folgenden wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellen in eine mit 19 ml vorgewärmten Medium vorbereitete Zellkulturflasche (T 75, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) ausgesät.

3.2.2 Mediumwechsel

Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und 20 ml frisches Medium hinzugegeben.

3.2.3 Subkultivierung der Zellen

Adhärenz Zellen sind durch Verankerungsmechanismen, die den physiologischen Zell-Matrix-Verbindungen sehr ähnlich sind, fest am Boden der Zellkulturflasche angeheftet. Deshalb müssen sie mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA, Sigma Aldrich) enzymatisch von der Unterlage gelöst werden. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, ohne Ca²⁺/Mg²⁺, pH = 7,4, Sigma Aldrich) gewaschen, da ein in der Flasche verbliebener FBS-Rest die Trypsinaktivität erheblich herabsetzen würde. Im Anschluss daran wurde 2 ml der Trypsinlösung hinzugegeben, die vorher auf 37°C erwärmt wurde. Da Trypsin bei 37°C das Wirkungsmaximum erreicht, wurde die Zellkulturflasche für kurze Zeit inkubiert

und das Ablösen der Zellen unter optischer Kontrolle beobachtet (Mikroskop, Axiovert 40C, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Um die Trypsinaktivität zu stoppen, wurde die gesamte Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen, durch mehrmaliges Spülen die noch anhaftenden Zellen abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Medium pipettiert. Nach dem Zentrifugieren (5 Minuten, 22°C, 300 g, Allegra X-15R, Beckman Coulter) wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Im Folgenden wurden die Zellen entweder nach Zellzählung auf Mikrotiterplatten mit unterschiedlicher, je nach geplantem Versuch gewünschter Wellzahl, ausgesät oder auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Dazu wurde der Zellsuspension so viel Medium hinzugefügt, dass in jede Kulturflasche, die bereits 19 ml Medium enthielt, 1 ml davon hinzupipettiert werden konnte.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung wurde in einem optischen Verfahren durchgeführt (Cedex XS, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), das auf der Trypanblau-Ausschlussmethode beruht. Das Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, life technologies) wird nur von Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen und macht somit eine Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen möglich. Nach Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml Medium wurden 10 µl dieser Zellsuspension und 10 µl Trypanblau in eine Durchflusszelle (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) aus Glas injiziert. Dann wurde der Objektträger ausgelesen (Cedex-2-Software) und die Zellsuspension entsprechend der gewünschten Zellkonzentration mit Medium verdünnt.

3.3 Herstellung der Sealereluate

Zunächst wurden Proben der drei zu untersuchenden Sealer in Ringen aus Edelstahl (16x10x2 mm; Lederer, Ennepetal, Deutschland) ausgehärtet (24 h, 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit). Der Total Fill BC Sealer und das Total RRM wurden dazu mit einer einfachen Spritze aufgetragen, während der AH plus-Sealer mit Hilfe eines Automix-Systems in einem 1:1 Verhältnis angemischt wurde. Nach der 24-stündigen Härtung wurden zur Herstellung der Sealereluate die einzelnen Probenkörper in 6-Well-Platten gesetzt, mit 4 ml α -MEM-Medium bedeckt und in

einer 5% CO₂ Atmosphäre bei einer Temperatur von 37°C gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Probenkörper entfernt, das Medium mit einer Spritze (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) aufgenommen und nach zweimaligem Filtrieren mit einem Spritzenfilter (0,45 µm Porengröße, VWR, Radnor, PA, USA) in Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Sealereluate wurden dann bei -20°C eingefroren.

3.4 Spezielle Methoden und Anwendungen

3.4.1 Herstellung von zytosolischen und nukleären Proteinextrakten

Für die Proteinextraktion bei den Western Blot Analysen wurde das NE-PER Nuclear and cytoplasmatic Extraction Kit (Thermo Scientific) verwendet. Dieses enthält das CER I, das CER II (Cytoplasmatic Extraction Reagent) und das NER (Nuclear Extraction Reagent).

Unmittelbar vor Gebrauch von CER I und NER wurde diesen ein Protease Inhibitor (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) hinzugefügt, damit während des Versuchs die Funktion und Integrität der Proteine aufrechterhalten wurde. Um Proteine aus den verwendeten Zellen zu isolieren, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen von PBS wurde erneut 700 µl PBS hinzugegeben und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber (Sarstedt) vom Boden abgelöst. Mit einer Pipette wurden noch anhaftende Zellen abgespült und die Zellsuspension dann in beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 300 g, Mikrofuge 18 Centrifuge, Beckman Coulter) wurde der Überstand abpipettiert. Mit Hilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagent erfolgte in den nächsten Schritten die Extraktion der zytosolischen und nukleären Proteine. Dazu wurde das Zellpellt mit 100 µl CER I resuspendiert, für 15 s auf einem Vortexer (IKA MS1Minishaker, Sigma Aldrich) vermischt und auf Eis gekühlt. Nach 10 Minuten Wartezeit wurden 5,5 µl CER II hinzugegeben, für 5 Sekunden auf einem Vortexmixer vermischt und für 1 min auf Eis gekühlt. Nachdem das Eppendorf-Reaktionsgefäß 5 min bei einer Drehzahl von 16000 g zentrifugiert wurde, erhält man im Überstand die zytosolischen Proteine, die für die weitere Versuche eingefroren werden können. Um nun auch die nukleären Proteine zu erhalten, wurde das aus Zellkernen bestehende Pellet

mit 50 µl eiskühlem NER resuspendiert und für 15 Sekunden auf dem Vortexer gemischt. In den folgenden 40 min wurde die Lösung auf Eis gekühlt und alle 10 Minuten auf dem Vortexer für 15 Sekunden geschüttelt. Nach Zentrifugation (16000g, 10 Minuten) konnten schließlich im Überstand die nukleären Proteine extrahiert werden.

3.4.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Quick Start Bradford Protein Assay (Bio- Rad, Hercules, CA, USA). Dieses Assay beruht auf dem Prinzip der quantitativen Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976), bei dem verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 zu proportionalen Farbveränderungen führen. In seiner an Proteine gebundenen Form hat der Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Als Proteinstandard zur Bestimmung der Konzentration über eine Standardgerade diente BSA (Bovines Serum Albumin, Bio-Rad).

Aus jeder Probe und dem Standardprotein in den Konzentrationen 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, und 1,5 mg/ml wurden jeweils 5 µl mit 245 µl Färbemittel (Bradford-Protein-Assay Dye) vermischt. Dann wurden sowohl vom Färbemittel, von den Standardprotein-, als auch von den Probenlösungen jeweils zweifach 100 µl in 96-Well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer (ELISA-Reader, Varioskan, Thermo Elektron Corporation) gemessen und die Messwerte in Excel (Microsoft, Redmond, USA) ausgewertet. Dabei wurde mit Hilfe des Blank-Wertes und der Standardproteinwerte eine Ausgleichsgerade mit Geradengleichung erstellt. Durch Auflösung der Geradengleichung nach dem x-Wert wurden dann die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet.

3.4.3 Zytotoxizitätsuntersuchung mittels WST-8

Die Zytotoxizität der Sealereluate wurde mit Hilfe des WST-8-Tests (Colorimetric Cell Viability Kit I, PromoKine, Heidelberg, Deutschland) untersucht. Das Prinzip des WST-8-Tests beruht darauf, dass Zellen mit intakter Atmungskette das schwach gelbe WST-8 (water soluble tetrazolium salt-8, 2-(2-methoxy-4-

nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium Salz) durch mitochondriale Dehydrogenasen in Anwesenheit eines Elektronentransporters (1-Methoxy-5-methylphenazinium-methyl-sulfat) in das wasserlösliche und orange Formazan reduzieren. Die mit der Reduktion entstandene Menge an Formazan-Farbstoff kann photometrisch gemessen werden und ist ein direktes Maß für die Anzahl vitaler Zellen. Abbildung 3 zeigt schematisch den Reaktionsablauf.

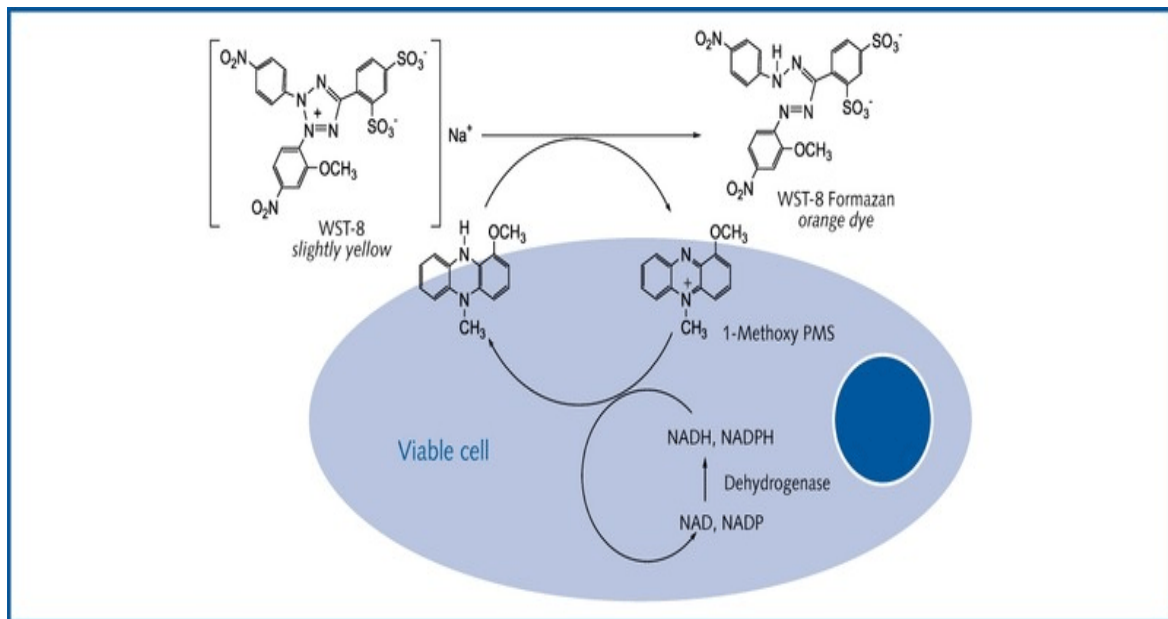


Abbildung 3: Mechanismus der WST-8 Umsetzung durch Dehydrogenasen in lebenden Zellen (PromoKine, Heidelberg, Deutschland)

Der WST-8-Test wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One) in 3-facher Bestimmung durchgeführt, wobei für jede Zelllinie drei unabhängige Versuchsreihen stattfanden. Dazu wurde nach einer Zellzählung die Anzahl der Zellen auf 50.000/ml mit Medium verdünnt und davon jeweils 100 µl auf jedes Well verteilt. Nach Inkubation der Zellen für 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Sealereluate jeweils verdünnt mit Medium in absteigenden Konzentrationen (pur, 1:2, 1:5, 1:10) zugegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit Medium und eine Positivkontrolle mit Triton X-100 1% (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol, Sigma Aldrich) durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Sealereluate entfernt und nach Verdünnung des WST-8-Reagens (CCVK-1-Lösung) in einem Verhältnis von 1:10 mit Medium jedem Well 100 µl davon hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von

120 min, bevor die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer gemessen wurde.

3.4.4 Untersuchung der Apoptoseinduktion mittels Caspase-Assay

Die Apoptose spielt neben der Differenzierung, Entwicklung und Homöostase in Geweben eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr des Immunsystems. Sie kann auch durch exogene Einflüsse wie zum Beispiel DNA-schädigende Agenzien hervorgerufen werden. Die Caspasen, die im Rahmen der Apoptose sehr bedeutend sind, liegen normalerweise als funktionell inaktive Zymogene in der Zelle vor. Ihre Aktivität entfalten sie durch sequentielle Spaltung (Cohen, 1997). Diese Beobachtung führte zum Konzept der kaskadenartigen Aktivierung der Caspasen, die mit der autokatalytischen Proteolyse der Initiatorcaspasen beginnt, die im Anschluss die sogenannten Effektorcaspasen prozessieren und ebenfalls aktivieren (Stennicke und Salvesen, 2000). Hier ist vor allem die Caspase-3 entscheidend, denn diese gehört zusammen mit der Caspase-6 und -7 zur Gruppe der Effektorcaspasen. Das Ziel der Caspasen ist schließlich die kontrollierte Zerstörung der Zellen von innen durch Spaltung verschiedener Zielmoleküle. Dabei kommt es zur Aktivierung von proapoptotischen und zur Inaktivierung antiapoptotischer Proteine (Zimmermann und Green, 2001). Abbildung 4 zeigt vereinfacht diese Kaskade.

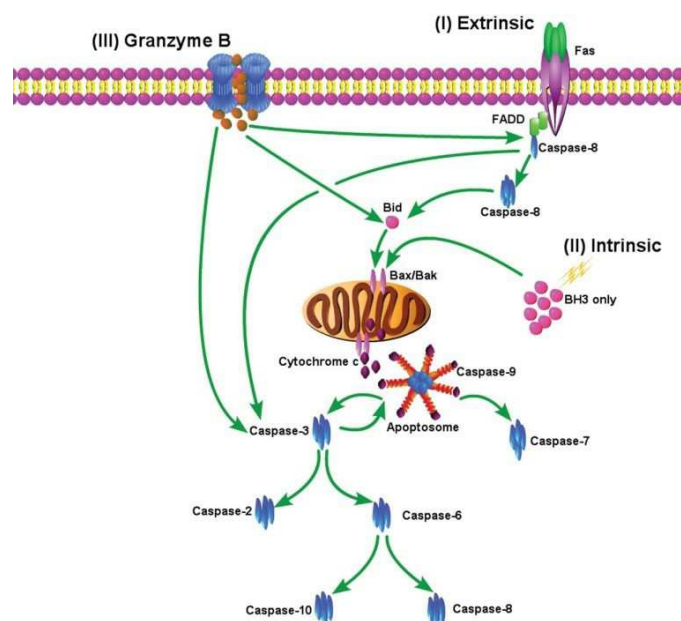


Abbildung 4: Aktivierungswege der Caspasen (nach Logue und Martin, 2008)

Als Maß für die Apoptoserate wurde die Aktivität der Caspase-3 mit dem Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (PromoKine) bestimmt. Diese Untersuchung basiert darauf, dass das Peptid-Substrat DEVD-pNA (Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid) durch die aktive Caspase-3 zu pNA (p-Nitroanilid) hydrolysiert wird und somit die Caspase-3-Aktivität direkt proportional zur freigesetzten Menge pNA ist. Das pNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 400 nm und kann im Photometer gemessen werden.

Nachdem die Zellen für eine bestimmte Zeit (24 h, 48 h) mit den Sealereluiten inkubiert wurden und mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Ablösung der Zellen mechanisch mittels Abschaben. Die Positivkontrolle wurde mit dem Apoptose induzierenden Transkriptionsinhibitor Actinomycin D durchgeführt, während zur Negativkontrolle Medium (α -MEM, 10% FBS) verwendet wurde.

Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (4 min, 300 g, Mikrofuge 18, Beckman Coulter), der Überstand abpipettiert und jeder Probe 50 μ l Cell Lysis Buffer hinzugegeben, wodurch es zu einer Zerstörung der Zellmembran kam. Nach zehnminütiger Lagerung der Proben auf Eis wurden diese erneut zentrifugiert (1 min, 10000 g, Mikrofuge 18), sodass man im Überstand die zytosolischen Proteine erhielt. Diese wurden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Für die weiteren Schritte mussten die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben mit Hilfe des Bradford Assay (siehe Abschnitt 2.5.2) bestimmt werden und auf identische Konzentrationen (40 mg Protein, 50 μ l Cell Lysis Buffer) verdünnt werden. Nachdem im Anschluss 300 μ l des 2X Reaction Buffer mit 3 μ l DTT (Dithiothreitol, 1,0 M) vermischt wurden, konnte jeder Proben 50 μ l davon und 5 μ l des DEVD-pNA (4 mM) zugegeben werden. Schließlich wurde auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte jeweils 100 μ l der einzelnen Proben aufgetragen und nach Inkubation (37°C) für 1-3 h die Extinktion bei 400 nm gemessen.

3.4.5 Genotoxizitätsnachweis mittels Mikronukleus-Test

Um das genotoxische beziehungsweise mutagene Potential der Sealereluate zu bestimmen, wurde ein Mikronukleus-Test durchgeführt. Das Grundprinzip dieses Versuchs beruht darauf, dass unter dem Einfluss von genotoxischen Substanzen

in den Zellen Chromosomenaberrationen und Schäden am Spindelapparat verursacht werden. Unter anderem treten nicht reparierte Doppelstrangbrüche auf. Während der Mitose können diese chromosomalen Fragmente nicht in die entsprechenden Kerne der Tochterzellen inkorporiert werden. Anstelle dessen kondensieren diese Chromosomenbruchstücke, bilden eine Kernmembran und formen sich so zu einem Mikronukleus. Die folgende Abbildung 5 veranschaulicht die Entstehung von Mikronuklei.

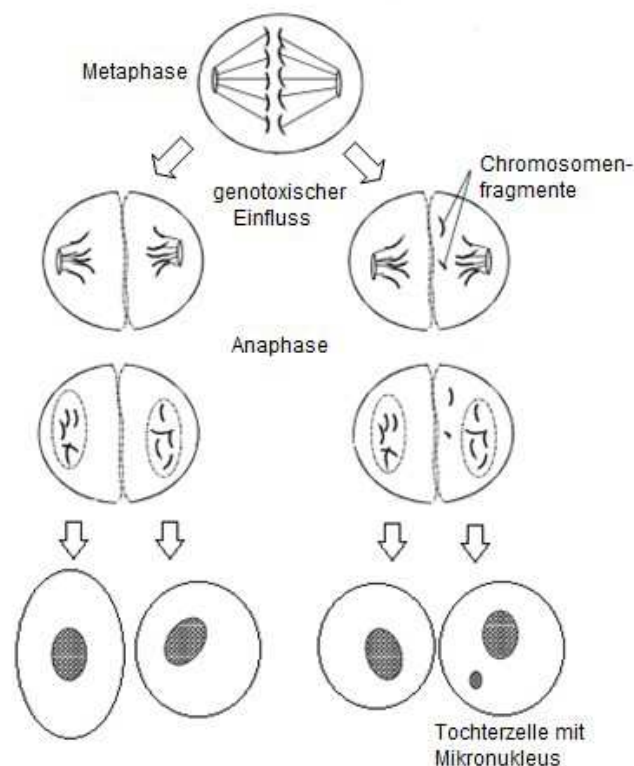


Abbildung 5: Schematische Darstellung zur Entstehung von Mikronuklei (modifiziert nach Al-Sabti und Metcalfe, 1995)

Um das Auftreten von Mikronuklei im Zytoplasma nachzuweisen, wurde die quantitative Färbung der Zellkern-DNA nach Feulgen und Rossenbeck (1924) durchgeführt. Die Reaktion basiert zunächst auf der Abspaltung der Purin- und Pyrimidinbasen der DNA durch Salzsäure, wodurch eine maximale Zahl an Aldehydgruppen freigesetzt wird. Die Grundlage der Färbung bildet dann die Verbindungsreaktion von fuchsin-schwefeliger Säure (Schiff'sches Reagenz) mit der 2-Desoxyribose zu rotvioletterm Farbstoff. Mit RNA (Ribonukleinsäure) fällt die Reaktion negativ aus, sodass spezifisch immer nur DNA markiert wird.

Nachdem die Zellen entsprechend Absatz 2.2.3 trypsinisiert und zentrifugiert worden waren, wurden sie auf eine Konzentration von 20.000/ml Medium verdünnt. Im Anschluss wurden die Zellen auf Objektträger, die mit Hilfe von Flexipermis in 8 Kompartimente getrennt worden waren, ausgesät. Pro Kompartiment wurden 250 µl der Zellsuspension verwendet. Die Zellen adhärten über Nacht an den Objektträger, am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit den Sealereluaten bedeckt. Als Positivkontrolle diente die genotoxische Substanz Ethylmethansulfonat (EMS, 300 µg/ml, Stopper und Lutz, 2002), als Negativkontrolle Zellkulturmedium (α-MEM, 10% FBS). Nachdem die Zellen für 48 Stunden mit den Sealereluaten inkubiert worden waren, wurden diese abgesaugt, die Präparate mit PBS gewaschen und für eine Stunde luftgetrocknet. Anschließend wurden diese eine Stunde lang in Formaldehydlösung (4%, pH = 6,9) fixiert und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Das im weiteren Verlauf verwendete DNA-Färbekit nach Feulgen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) enthielt drei Reagenzien. Das Reagenz 1 enthielt 5 M Salzsäure. Im zweiten Reagenz befand sich das Schiffs Reagenz und im dritten ein Natriumdisulfit-Konzentrat.

Zusätzlich wurde eine Natriumdisulfit-Spüllösung frisch hergestellt, die aus 95% destilliertem Wasser, 5% Natriumdisulfit-Konzentrat (100 g/l Na₂S₂O₅, Reagenz 3) und 1% Salzsäure (Reagenz 1) bestand.

Das folgende Schema (Tabelle 1) zeigt den weiteren Ablauf der Färbung, die in Färbeküvetten durchgeführt wurde:

Substanz	Zeit
Salzsäure (5 mol/l, 22°C)	50 min
Aqua dest.	2 min
Aqua dest.	2 min
Schiffs-Reagenz (lichtempfindlich, Färbung im Dunkeln)	60 min
frisch hergestellte Natriumdisulfit-Spüllösung	3 min

Aqua dest.	2 min
Aqua dest.	2 min
Isopropanol 70%	4 min
Isopropanol 80%	4 min
Isopropanol 90%	4 min
Isopropanol 99%	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min

Tabelle 1: Ablauf der Färbung nach Feulgen

Im Anschluss an die Färbevorgänge wurden die Xylol-feuchten Präparate mit Entellan (Merck) und einem Deckglas eingedeckt und über Nacht getrocknet. Der Anteil der Mikronuklei wurde mikroskopisch bestimmt, indem pro Zellkammer 500 Zellen gezählt wurden.

3.4.6 Einfluss der Sealereluate auf die zelluläre Entzündungskaskade

3.4.6.1 EIA zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration

Prostaglandin E₂ stellt einen Endpunkt des Cyclooxygenase-Wegs bei Entzündungen dar. Durch entzündliche Stimulation von Zellen kommt es zu einer vermehrten Expression von COX-2, dies führt wiederum zu einer Erhöhung des lokal wirkenden Mediators PGE₂, der für eine Vielzahl von klinischen Entzündungszeichen eine wichtige Rolle spielt.

In dieser *in-vitro* Versuchsreihe wurden dazu hPDLF zum einen Teil mit den Sealereluat allein, zum anderen Teil mit den Sealereluat und zusätzlich IL-1 β (2 ng/ml) für 24 Stunden inkubiert. Interleukin 1 β ist ein bekannter Stimulator für die vermehrte Expression von COX-2 und damit PGE₂. Die Sealereluate von AH plus wurden zuvor im Verhältnis 1:1 mit Medium verdünnt, um die zytotoxischen Effekte dieses Sealers zu reduzieren. Als Hemmkontrolle wurde Indomethacin, ein unselektiver COX-1 und COX-2-Inhibitor in einer Konzentration

von 300 nM eingesetzt (Nalamachu und Wortmann, 2014). Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration wurde das PGE₂ high sensitivity EIA kit (ENZO Life Sciences, Lörrach, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um ein kompetitives Immunassay. Das bedeutet, dass die mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase) markierten PGE₂ des Kits mit den unmarkierten PGE₂-Molekülen der Probe um eine begrenzte Zahl an PGE₂-spezifischen Bindungsstellen der Antikörper-Lösung konkurrieren. Die entstandenen Komplexe binden an einen auf den Mikrotiterplatten fixierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper. Durch das nachfolgende Waschen werden somit nur überschüssige Reagenzien entfernt und die Komplexe aus Antikörper und PGE₂ oder alkalische-Phosphatase-gekoppeltem-PGE₂ bleiben gebunden. Durch die Zugabe der Substratlösung kommt es zu einer gelblichen Farbentwicklung, da die an das PGE₂ gekoppelte alkalische Phosphatase das Para-Nitrophenylphosphat in das gelbe Nitrophenol umsetzt. Die Intensität der Farbe ist demnach proportional zur PGE₂ -Konzentration in der Probe.

Zur Kalibrierung wurde zunächst eine PGE₂-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden sieben Eppendorf-Reaktionsgefäße beschriftet und in Nummer 1 950 µl Zellkulturmedium gegeben, während in die übrigen 500 µl davon gegeben wurden. Danach wurden 50 µl der 50.000 pg/ml PGE₂- Standardlösung in das erste Gefäß gegeben und mit dem Vortexer vermischt. Das folgende Pipettierschema zeigt das Vorgehen und die Konzentrationen der Verdünnungsreihe (Abbildung 6):

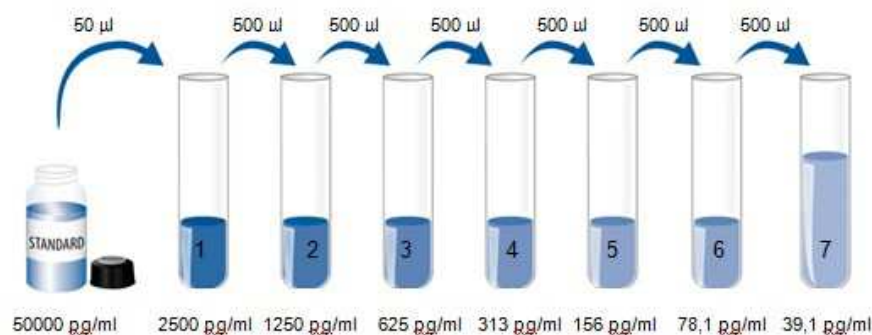


Abbildung 6: Standard-Verdünnungsreihe des PGE₂ EIAs (ENZO Life Sciences)

150 μ l Assay Buffer wurden in die NSB (Non-Specific-Binding)- Wells gegeben und 100 μ l Assay Buffer in die B_0 (Maximum Binding)- Wells. Danach wurden jeweils 100 μ l des Zellkulturüberstandes beziehungsweise 100 μ l der Standards in die entsprechenden Wells gegeben. Die Wells für die Blanks wurden freigelassen. Im nächsten Schritt wurden allen Wells jeweils 50 μ l Konjugat (mit Ausnahme der Blanks) und 50 μ l Antikörperlösung (mit Ausnahme der Blanks und der NSB Wells) hinzugefügt. Nach Inkubation der luftdicht verschlossenen 96-Well-Platte unter kontinuierlichem Schütteln über Nacht bei 4°C wurden die Reagenzien durch dreimaliges Waschen der Wells mit jeweils 400 μ l Waschlösung entfernt und die Platte durch Ausklopfen auf Zellstoff getrocknet. Nachdem 200 μ l des pNpp (para-Nitrophenyl-phosphat) - Substrates zu jedem Well hinzugegeben worden waren, erfolgte eine einstündige Inkubation der luftdicht verschlossenen 96-Well-Platte ohne Schütteln bei 37°C. Dann wurde sofort nach Zugabe von 50 μ l der Stop-Lösung die Extinktion der entstandenen Färbung bei 405 nm in einem ELISA-Reader (Varioskan) ausgelesen. Anschließend wurden die Mittelwerte der Proben und Standards ermittelt und davon jeweils der Wert der nicht-spezifischen Bindung (NSB) subtrahiert. Nach Berechnung der prozentualen Anteile der Standard- und Probenwerte vom Wert der maximalen Bindung (B_0) konnte eine Eichkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die PGE_2 -Konzentrationen der Proben mittels Interpolation ermittelt werden konnten. Die Abbildung 7 zeigt eine typische Standardkurve.

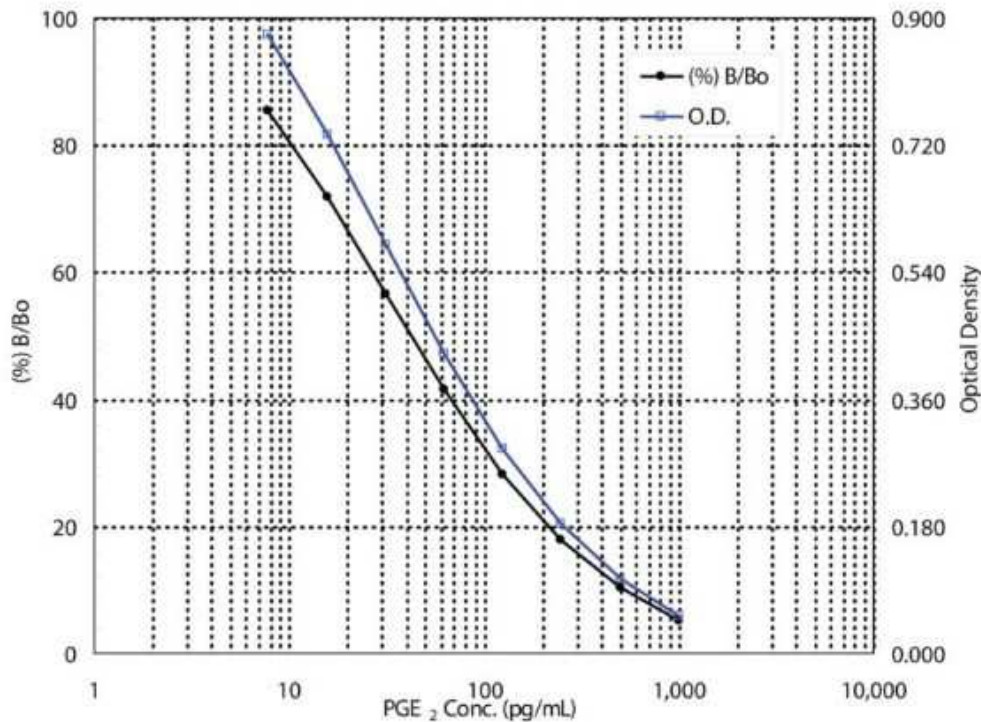


Abbildung 7: Standardkurve zur Ermittlung der PGE₂-Konzentration (ENZO Life Sciences)

3.4.6.2 ELISA zur Bestimmung der IL-6-Konzentration

Das IL-6 ist ein pleiotrop wirksames Zytokin, das wesentlich an der Regulation der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Als Stimuli für die Freisetzung von IL-6 gelten IL-1 β , TNF- α und bakterielle Endotoxine wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (Akira *et al.*, 1992). Der IL-6-Rezeptor wird von verschiedenen Zellen exprimiert. Darunter befinden sich unter anderem aktivierte B-Zellen, periphere Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Mastzellen (Ansel *et al.*, 1990).

Die hPDLF-Zellen wurden dazu in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und die Sealereluate in je ein Well gegeben und eine Stunde präinkubiert. Es erfolgte zur Induktion einer entzündlichen Reaktion die Zugabe von TNF- α (25 U/ml) für 15 min. Als Hemmkontrolle wurde Dexamethason eingesetzt (25 mM). Dabei handelt es sich um ein künstliches Glukokortikoid, das antiphlogistische, antiallergische und immunsuppressive Wirkungen aufweist. Somit unterdrückt es unspezifisch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen erneut mit den Sealerelaten bedeckt und weitere

24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Um die IL-6-Konzentration in den Überständen zu bestimmen, wurde ein ELISA Assay (Human IL-6 Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um ein nicht-kompetitives Immunoassay, das auch als Sandwich-ELISA bezeichnet wird. Hier wird das IL-6 von zwei Antikörpern gebunden, die beide spezifisch mit dem Antigen reagieren und sich gleichzeitig nicht blockieren. Der monoklonale Primär-Antikörper ist auf den Mikrotiterplatten fixiert und bildet nach Zugabe der Proben mit den darin enthaltenen IL-6-Molekülen Komplexe. Nach der Entfernung der Proben wird der enzymgekoppelte polyklonale Sekundär-Antikörper appliziert, der ebenfalls an das IL-6 bindet. Schließlich kann nach Beseitigung des ungebundenen Antikörper-Enzym-Reagens durch Zugabe einer Substratlösung, dessen Substrat vom Enzym des Sekundär-Antikörpers umgesetzt wird, eine Farbentwicklung beobachtet werden, die proportional zur IL-6-Menge in der Probe ist.

Zunächst wurde eine IL-6-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden beschriftet und nach dem folgenden Pipettierschema verdünnt (Abbildung 8):

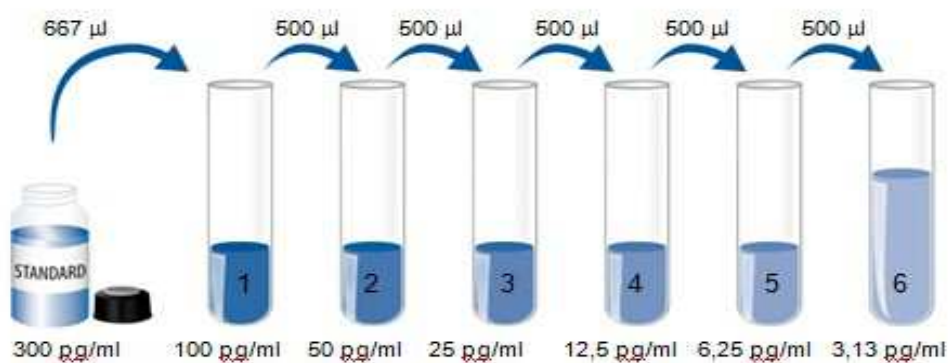


Abbildung 8: Standard-Verdünnungsreihe des IL-6 ELISAs (R&D Systems)

In jedes Well wurden 100 µl der Assay-Lösung RD1W pipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 100 µl der Proben beziehungsweise der Standards in die jeweiligen Wells, woraufhin eine zweistündige Inkubation der luftdicht verschlossenen Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur folgte. Im Anschluss wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte entfernt und die Wells durch viermaliges Waschen

mit jeweils 400 µl Waschpuffer von ungebundenen Substanzen befreit, bevor in jedes Well 200 µl des Konjugats, das den Sekundärantikörper enthält, hinzugefügt wurden. Nach einer weiteren Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur und erneutem viermaligem Waschen mit jeweils 400 µl Waschpuffer, wurde jedem Well 200 µl Tetramethylbenzidin-Lösung hinzugefügt und die Mikrotiterplatte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Durch die Zugabe von 50 µl der Stop-Lösung veränderte sich die Farbe in jedem Well von blau zu gelb und die Extinktion konnte photometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader (Varioskan) gemessen werden. Nach Berechnung der Mittelwerte der Extinktion für die Standards, Kontrollen und Proben und jeweiligen Subtraktion des Blindwerts konnte eine Standardkurve erstellt werden. Aus dieser konnten die IL-6-Konzentrationen der Proben mittels Interpolation abgelesen werden.

3.4.6.3 Immunochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors NFκB

Als erster Schritt einer zellulären Reaktion steht die Steigerung und Senkung der Expression von Transkriptionsfaktoren. Daher soll ein für die Entzündungsreaktion essentieller Weg, die NFκB-Kaskade an der Stelle der Aktivierung des Transkriptionsfaktors untersucht werden. Dazu wurden die zytosolischen und nucleären Proteine aus den Zellen extrahiert und mittels Gelelektrophorese und Western Blot genauer analysiert. Ein Western Blot dient dem immunochemischen Nachweis von Proteinen auf einer Träger- Membran (Thermo Fisher). Zunächst wird ein Proteingemisch mittels der SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt. Dabei wird die Fähigkeit der Proteine genutzt mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladene Komplexe zu bilden. Die von einem Protein gebundene SDS-Menge und damit die Ladung des Protein-SDS-Komplexes ist etwa proportional zur Größe des Proteins, sodass die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Der als Blotting bezeichnete Transfer der aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel (Biorad) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) erfolgt unter Nutzung eines elektrischen Feldes. Der immunochemische Nachweis der auf die Membran übertragenen Proteine läuft indirekt ab: Zunächst wird ein primärer Antikörper an die nachzuweisenden Proteine gebunden, der dann durch einen für den primären Antikörper

spezifischen Sekundärantikörper gebunden wird. Da dieser Sekundärantikörper mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, wird die im nächsten Schritt hinzugegebene Substratlösung von diesem umgesetzt. Dadurch können schließlich die Komplexe aus Antigen, Primär- und Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden.

Nachdem die Proteine wie oben bereits beschrieben extrahiert, die Proteinkonzentration mit Hilfe des Bradford Assays bestimmt und die Proteine mit H₂O so verdünnt wurden, dass in allen Proben die gleiche Proteinmenge enthalten war, konnte die SDS-PAGE durchgeführt werden. Dazu wurden jedem Eppendorf-Reaktionsgefäß ein vierfach konzentrierter Laemmli Ladepuffer mit β -Mercaptoethanol in einem Volumen, das 25% des Probenvolumens entspricht, hinzugefügt. Dieser denaturiert die Proteine während Inkubation (5 min, 95°C) in einem Eppendorf Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Deutschland) und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung. Für die Gelelektrophorese wurde ein 12%-iges Polyacrylamid-Gel als Trägermaterial verwendet, wobei 5 μ l des Größenstandards (Bio-Rad, Kaleidoskop Standards) und 12 μ l der Proteinlösungen in die Geltaschen aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Proteine in 1X SDS Laufpuffer bei konstanter Spannung von 180 V für 40 Minuten aufgetrennt. Dabei wurde eine vertikale Elektrophoresekammer (BioRad) verwendet. Im Anschluss folgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine durch Wet-Blotting. Die Blotkassette bestand aus einem Schwamm, zwei Blotting-Papieren, einer Membran aus PVDF (Polyvinylidenfluorid), die in Methanol (100%) aktiviert wurde, und dem Gel. Die Blotkammer wurde schließlich mit Transferpuffer (20% v/v Methanol) aufgefüllt und der Blot bei konstanter Stromstärke (200 mA) für 45 min im Kühlraum durchgeführt. Um nach dem Transfer spezifische Proteine nachzuweisen, mussten unspezifische Antikörperbindungen verhindert werden, indem freie Bindungsstellen auf der Blotmembran mit 3% BSA in TBS-T (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween) für 60 min blockiert wurden. Im Anschluss daran wurden die Membranen über Nacht im Kühlraum mit den 1:000 in 3% BSA verdünnten Primärantikörpern (rabbit anti- κ B α , #4812, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) inkubiert und nach dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten mit TBS-T für 60 min bei Raumtemperatur mit dem 1:1000 in 5% Magermilchpulver verdünnten

Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert, #7074, Cell Signaling) inkubiert, die mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt waren. Nach weiteren Waschschritten (4 x 5 min, TBS-T) wurden die Membranen für 5 min mit der Luminol-basierten Substratlösung (Super-Signal Pico, Thermo Scientific, MA, USA) inkubiert, welche zuvor im Verhältnis 1:1 entsprechend der Herstellerangaben gemischt wurde. Die durch die Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation des Luminols findet unter Emission von Licht in Form von Chemolumineszenz statt. Diese wurden mit Hilfe eines Gel-Dokumentationsgeräts (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt.

3.4.7 Untersuchung einer möglichen osteogenen Differenzierung

3.4.7.1 ELISA auf Osteocalcin

Osteocalcin, das auch unter dem Namen Bone-Gla-Protein (BGP) bekannt ist, stellt ein 5,9 kDa großes, nur aus 49 Aminosäuren bestehendes Eiweißmolekül dar. Es spielt sowohl in der Knochenphysiologie, als auch im Stoffwechsel des gesamten Körpers eine bedeutende Rolle (Zoch *et al.*, 2015). Osteocalcin wird ausschließlich von Osteoblasten und Odontoblasten produziert und dient somit als Marker für die osteogene Differenzierung von Stammzellen.

Für den Versuch wurden jeweils hMSC als auch hPDSC-hTERT für 72 Stunden mit den Sealereluaten inkubiert. Die Überstände wurden nach dieser Zeit abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Als Positivkontrolle wurde ein Medium mit osteogenen Zusätzen verwendet (100 nM Dexamethason, 0,05 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, Jaiswal *et al.*, 1997). Die Versuche wurden für beide Zellarten jeweils dreifach durchgeführt.

Die Bestimmung der Konzentration von Osteocalcin im Zellkulturüberstand erfolgte mit dem Human Osteocalcin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). Dieses Kit stellt ein quantitatives Sandwich-Enzymimmunoassay im Mikrotiterplattenformat dar. Wie auch beim IL-6-ELISA wird hier das Osteocalcin von zwei Antikörpern gebunden. Einerseits befindet sich am Boden der Wells der Mikrotiterplatte ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für humanes Osteocalcin ist, andererseits kann nach Zugabe und darauffolgender Entfernung

der Proben und Standards ein enzymgekoppelter monoklonaler Antikörper, der ebenfalls spezifisch für humanes Osteocalcin ist, an dieses binden. Durch die darauffolgende Zugabe der Substratlösung kommt es zu einer Farbentwicklung, die die Menge an Osteocalcin in den einzelnen Proben angibt.

Nach Zugabe von 300 µl des Standard-Verdünnungsmediums in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde nach folgendem Pipettierschema mit Hilfe der Stammlösung (128 ng/ml Osteocalcin) auch bei diesem ELISA eine Standardverdünnungsreihe hergestellt (Abbildung 9):

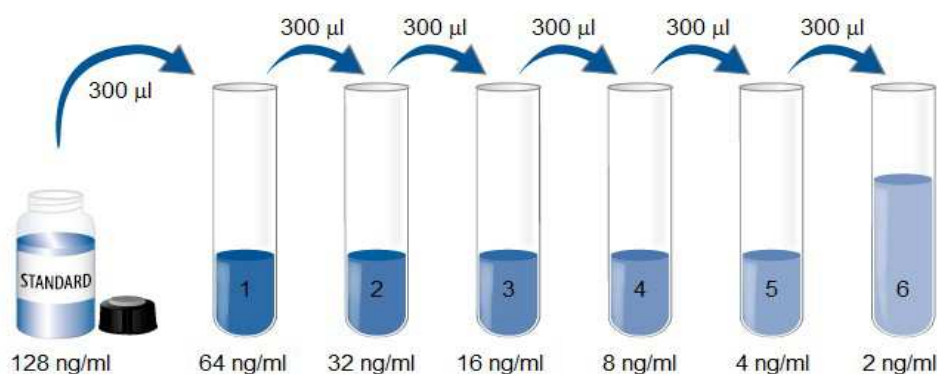


Abbildung 9: Standardverdünnungsreihe des Osteocalcin ELISAs (R&D Systems)

Zunächst wurde in jedes Well der Mikrotiterplatte 100 µl der Assay-Lösung RD1-117 pipettiert. Danach wurden 50 µl jeder Probe, jedes Standards und jeder Kontrolle in die Kavitäten der Mikrotiterplatte hinzugefügt. Nachdem die Platten luftdicht abgedeckt für 2 h bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert worden waren, konnten alle Substanzen durch viermaliges Waschen mit jeweils 400 µl Waschpuffer entfernt werden und zum Trocknen auf Zellstoff ausgeklopft werden. Daraufhin wurde in jede Kavität 200 µl des humanen Osteocalcin Konjugates pipettiert. Dieses enthält den mit Meerrettichperoxidase konjugierten monoklonalen für Osteocalcin spezifischen Antikörper. Es folgte eine zweistündige Inkubation, die wiederum bei Raumtemperatur und unter kontinuierlichem Schütteln stattfand. Nachdem ein weiterer Waschschrift durchgeführt worden war, wurden jedem Well 200 µl der Substrat-Lösung hinzugefügt, mit der die einzelnen Wells 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Schließlich wurden jedem Well 50 µl der Stop-Lösung hinzugefügt, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau zu gelb kam. Nach

diesem Schritt wurde sofort die Extinktion in einem ELISA-Reader (Varioskan) bei 540 nm gemessen. Anschließend wurden die Mittelwerte für die Proben, Kontrollen und Standards bestimmt. Mit den Mittelwerten der Standards wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die Osteocalcin-Konzentrationen in den vorhandenen Proben und Kontrollen ermittelt werden konnte.

3.4.7.2 Immunochemischer Nachweis von RUNX2

RUNX2 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Zellen. Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt bei Stammzellen mesenchymaler Herkunft zu einer Steigerung der Expression von Proteinen, die mit einer osteogenen Differenzierung in Verbindung gebracht werden (Komori, 2006; Vimalraj *et al.*, 2015). Hier sind insbesondere Osteocalcin, Osteopontin sowie die alkalische Phosphatase zu nennen.

In dieser Studie wurden zum Nachweis von RUNX2 sowohl hMSC, als auch hPDSC_hTERT für 72 Stunden mit Eluaten der potentiell osteogenen Sealer inkubiert. Als Positivkontrolle wurde wiederum ein Medium mit den beschriebenen osteogenen Zusätzen verwendet. Anschließend wurden in gleicher Weise wie beschrieben, die nukleären Proteine aus den Zellen extrahiert, die Konzentration bestimmt und eine SDS-PAGE durchgeführt. Nach dem gleichen Prinzip wie bei dem Nachweis von $\text{ikB}\alpha$ wurde ein Western Blot mit anschließender optischer Auswertung mit einem gegen RUNX2 gerichteten Antikörper durchgeführt (#12556, rabbit anti-RUNX2, Cell Signaling). Die Ladungskontrolle erfolgte bei den Kern-Proteinen mit Cyclin B1 (# 4138, rabbit anti-Cyclin B1, Cell Signaling).

3.4.7.3 Immunzytochemischer Nachweis von Markerproteinen

Um die osteogene Differenzierung der Stammzellen nachzuweisen beziehungsweise zu widerlegen, wurde das Prinzip der Immunzytochemie angewandt.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen von den Kulturflaschen auf Objektträger transferiert. Dazu wurden die Zellen entsprechend Absatz 2.3.3 trypsiniert, zentrifugiert und das Zellpellet so resuspeniert, dass eine Konzentration von 40.000/ml Medium vorhanden war. Auf sterile, unbeschichtete Glasobjektträger wurden dann Flexipermis mit 8-Kammern aufgebracht und 250 μl

der Zellsuspension in jede Kammer pipettiert. Über Nacht adhärten die Zellen und am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig entfernt. Im Anschluss wurden die Zellen für 48 Stunden mit den Sealereluaten inkubiert, wobei wiederum pro Kammer ein Volumen von 250 µl verwendet wurde und nach den ersten 24 Stunden die Sealereluate erneuert wurden. Nach 48 Stunden wurden die Sealereluate vorsichtig entfernt und die Objektträger mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch Eintauchen der Objektträger in -10°C kaltem Methanol für 5 Minuten und anschließendem 5-minütigem Lufttrocknen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger zur Permeabilisierung der Zellen für 5 Minuten in 0,2%-igem Triton X-100 in PBS auf Eis gelagert. Mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland), der Barrieren für Flüssigkeiten schafft, wurden die acht Felder auf den Objektträgern nun so umrandet, dass in den folgenden Schritten auf einem Objektträger unterschiedliche Antikörper-Konzentrationen sowie Positiv- und Negativkontrollen aufgetragen werden konnten. Jetzt wurden die Zellen zum Absättigen unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper für 60 Minuten mit Serum blockiert. Das Serum wurde dazu in einem Verhältnis von 1:20 mit PBS verdünnt. Außerdem wurde das Serum so gewählt, dass dieses und der Sekundärantikörper aus der gleichen Spezies stammten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert (siehe Tabelle 2). Für die Inkubation mit den Primärantikörpern wurden alle verwendeten Antikörper in ihrer entsprechenden Verdünnung mit PBS gemischt, das 3% Serum enthielt, und auf die einzelnen Felder aufgetragen (siehe Tabelle 3). Am nächsten Tag wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS die Zellen mit dem Sekundärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, nachdem diese genauso wie die Primärantikörper in PBS (mit 3% Serum) entsprechend verdünnt worden waren. Die Sekundärantikörper waren gegen die Tierart gerichtet, in der der jeweilige Primärantikörper hergestellt worden war. So wurde zum Beispiel für den Aktin-Primärantikörper, der in der Ziege erzeugt worden war, ein Sekundärantikörper verwendet, der gegen Ziegenproteine gerichtet war. Am Ende wurden die Objektträger in PBS getaucht, um den Sekundärantikörper vollständig zu entfernen und mit dem ProLong® Gold Antifade Reagent (Cell Signaling) eingedeckt. Für die Überprüfung der Spezifität der

Antikörper wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurden auf einem Feld statt dem Primärantikörper PBS und anschließend der Sekundärantikörper aufgetragen. So konnte sichergestellt werden, dass der Sekundärantikörper keine Hintergrundfärbung besaß.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Actin	Actin Maus mAb #3700 (1:600, Cell Signaling)	Esel Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 (1:200, Jackson Immuno Research)
Lamin B2	Lamin B2 mAb #12255 (1:600, Cell Signaling)	Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:600, Cell Signaling)
Osteonectin	Maus SPARC IgG1 (1:25, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA)	Esel Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 (1:200, Jackson Immuno Research)
Fibronectin	Maus Fibronectin-Antikörper (Fn-4:sc-53286, 1:25, Santa Cruz Biotechnologies)	Esel Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 (1:200, Jackson Immuno Research)

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzversuche

Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (LSM 510, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Durch Belichtung mit Licht aus einer Halogenlampe werden die fluoreszenzmarkierten Antikörper angeregt und emittieren Licht einer für den Antikörper typischen Wellenlänge (z.B. 488 nm bei Alexa Fluor 488 markierten Antikörpern). Eine entsprechende Auswahl an Filtern im Analyse-Strahlengang des Mikroskops kann selektiv dieses Fluoreszenzlicht dargestellt werden.

3.5 Statistische Auswertung

Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt je nach Versuch deskriptiv und graphisch. Für die statistische Auswertung wurde bei den WST-8-Untersuchungen und den ELISA/EIAs eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem LSD oder Tukey-HSD Post-Hoc-Test (α -Level 0,05). Dabei kam die Software SPSS (v23, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) zum Einsatz.

4 Ergebnisse

4.1 Zytotoxizitäts- und Genotoxizitätsuntersuchungen

4.1.1 WST-8

Abbildung 10 präsentiert die Zellviabilität der HGF-1, hPDLF und hOB nach 24-stündiger Exposition mit den Eluaten des AH plus- und Total Fill BC Sealer sowie des Total Fill RRM. Die im Diagramm aufgetragenen Werte stellen die Überlebensrate in % zur Negativkontrolle (α -MEM, 10% FBS) dar und sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen.

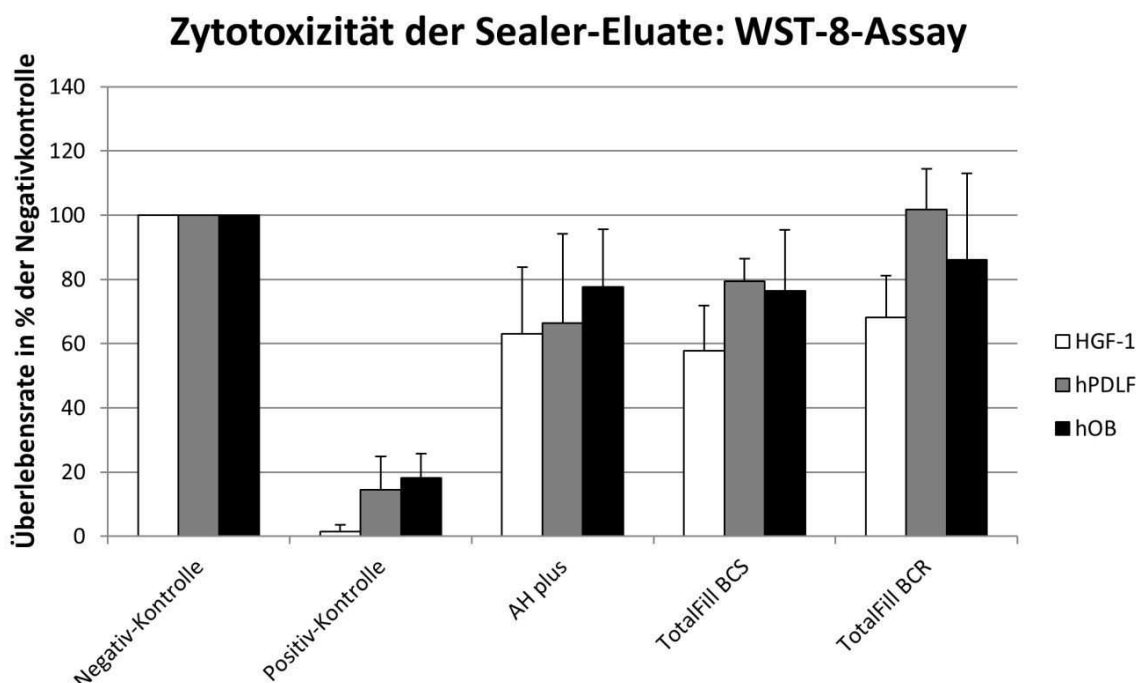


Abbildung 10: Ergebnisse des WST-8-Testes zur Untersuchung der Zytotoxizität der Sealereluate

Die Zellviabilitäten von AH plus wiesen in allen Konzentrationen und in jeder untersuchten Zellart Werte zwischen 63,01% bis maximal 90,57% auf. Dagegen erreichten das Total Fill RRM und der Total Fill BCS Maximalwerte von bis zu 102,22% beziehungsweise sogar 110,40%, was auf eine Proliferation der Zellen hinweisen könnte. Auch die Minimalwerte der Zellviabilität von Total Fill BCS und -RRM übertrafen die des AH plus bis auf eine Ausnahme (Total Fill BCS pur, HGF-1: 57,79) und lagen für die hPDLF bei 79,49% und für die hOB bei 76,51%. Im Vergleich mit Total Fill BCS und -RRM wies AH plus demnach die höchste

Zytotoxizität auf, während zwischen Total Fill BCS und -RRM keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen waren. Auffällig war zudem, dass die hPDLF verglichen mit den beiden anderen Zellarten für Total Fill BCS und -RRM stets die höchsten Viabilitätswerte lieferten, während unter AH plus Exposition die hOB die höchsten Werte aufwiesen. Die HGF-1 zeigten bis auf einzelne Ausnahmen (Total Fill BCS 1:2, 1:5 und Total Fill RRM 1:5, 1:10) die niedrigsten Zellviabilitäten im Vergleich zu den hPDLF und hOB. In einer durchgeführten Varianzanalyse mit Tukey-HSD Post-Hoc-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Negativkontrolle und den unverdünnten Sealereluaten.

4.1.2 Caspase-3 Assay

Eine weitere Möglichkeit die Biokompatibilität der Sealer zu untersuchen, besteht darin festzustellen ob und in welchem Maße in den ihnen exponierten Zellen eine Apoptose ausgelöst wird.

Nachdem die hPDLF für 24 Stunden mit den Sealereluaten bedeckt worden waren, wurde die Aktivität der Caspase-3 gemessen. Der Anstieg der Caspase-3-Aktivität ist in folgender Abbildung 11 in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben und stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen dar.

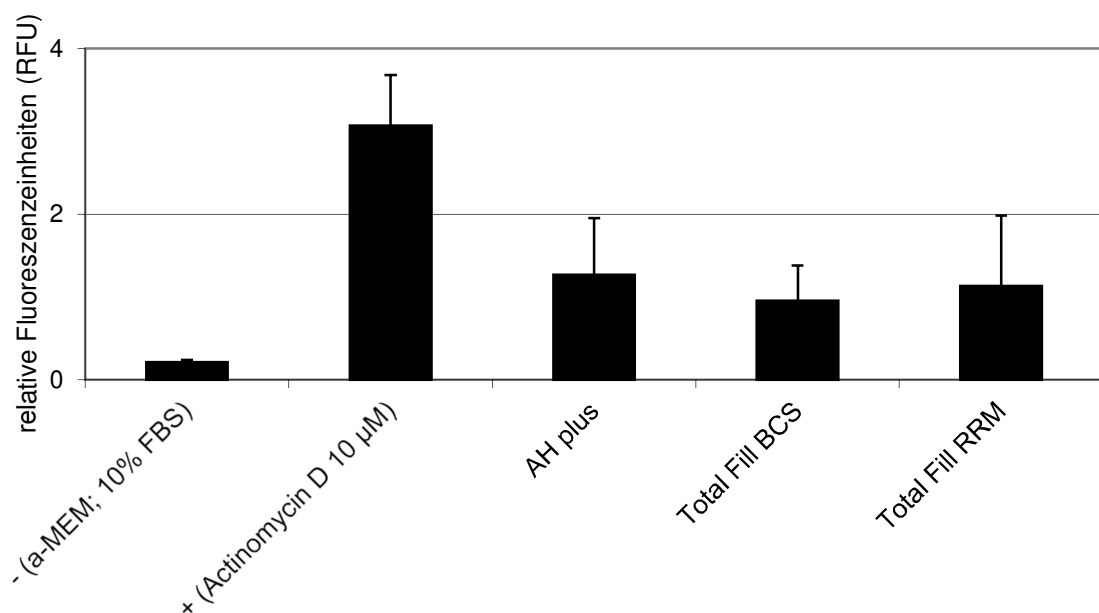


Abbildung 11: Ergebnisse des Caspase-3-Assays zur Bestimmung der Apoptoseinduktion durch Sealereluaten

Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität der hPDLF durch den Kontakt mit jedem der drei verschiedenen Sealereluat im Vergleich mit der natürlich vorhandenen Caspase-3-Aktivität in der Negativkontrolle. Die Caspase-3-Aktivität nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: AH plus (1,27), Total Fill RRM (1,13), Total Fill BCS (0,96). Jedoch konnten zwischen den einzelnen Sealern nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Das Actinomycin D verursachte einen starken Anstieg der Caspase-3-Aktivität, der im Vergleich mit den Sealereluat mehr als das Doppelte betrug.

4.1.3 Mikronukleus Assay

Um neben einer möglichen Zytotoxizität auch das genotoxische Potential der untersuchten Sealer festzustellen, wurde der Mikronukleus Assay durchgeführt.

Nachdem die hPDLF für 48 Stunden mit den Sealereluat inkubiert worden waren, wurden mittels des DNA-Färbekits nach Feulgen der Zellkern und eventuell entstandene Mikronuklei sichtbar gemacht. In der folgenden Abbildung ist für jede Substanz die jeweilige Anzahl der unter dem Lichtmikroskop gezählten Mikronuklei mit den Mittelwerten aus allen drei Versuchsreihen und der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Pro Zellkammer wurden 1000 Zellen gezählt.

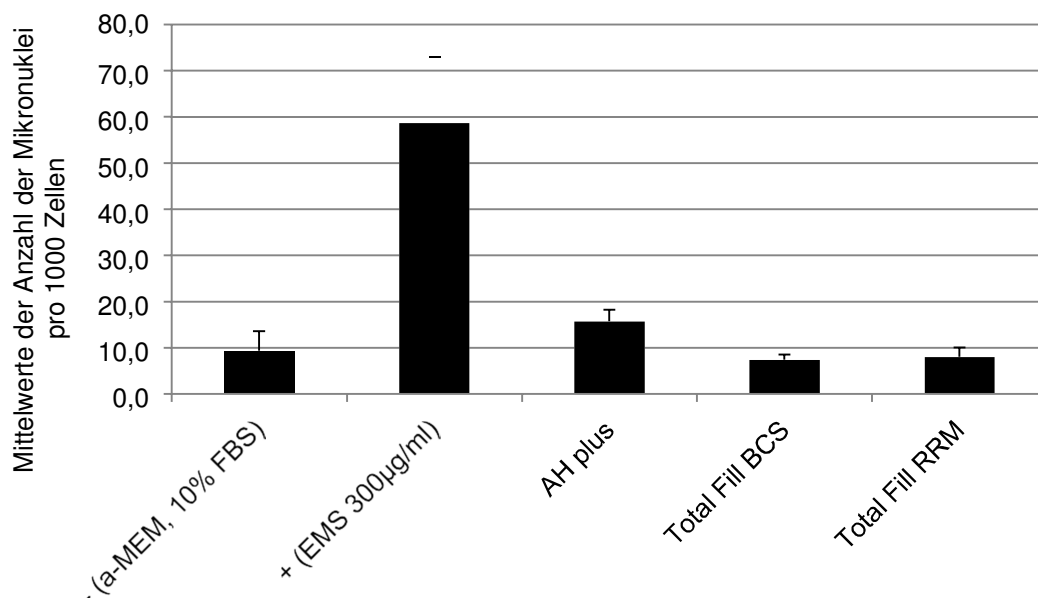


Abbildung 12: Ergebnisse des Mikronukleus-Assays zur Untersuchung der Genotoxizität der Sealer. Die Positivkontrolle mit EMS zeigte in allen drei Versuchsreihen gegenüber der Negativkontrolle deutlich erhöhte Mikronukleus-Raten. Der Mittelwert der

Positivkontrolle erhöhte sich mit 58,7 gezählten Mikronuklei pro 1000 Zellen um mehr als das sechsfache gegenüber der Negativkontrolle mit 9,3 Mikronuklei pro 1000 Zellen. Während die Anzahl der Mikronuklei durch die Inkubation der hPDLF mit dem Sealer AH plus gegenüber der Negativkontrolle im Mittel einen leichten Zuwachs verzeichnete (15,7 Mikronuklei/1000 Zellen), konnten für die beiden Total Fill Substanzen keine erhöhten Mikronukleus-Raten festgestellt werden (Total Fill BCS 7,3 Mikronuklei/1000 Zellen, Total Fill RRM 8,0 Mikronuklei/1000 Zellen).

4.2 Beeinflussung des Entzündungsgeschehens

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchung der Auswirkungen der Sealereluate auf zelluläre Entzündungskaskaden dargestellt.

4.2.1 EIA auf PGE₂

Diese Versuchsreihe zielte darauf ab, den Einfluss der Sealereluate auf die Aktivität der Cyclooxygenase-2 festzustellen, indem die Konzentrationen von PGE₂ in Zellkulturüberständen mittels EIA bestimmt wurde. In einem Vorversuch musste zunächst festgestellt werden, welche Konzentration an IL-1 β notwendig ist, um eine ausreichende Aktivität der COX-2, und damit Bildung von PGE₂ zu erreichen. Hierbei zeigte sich, dass bereits bei einer IL-1 β -Konzentration von 2 ng/ml eine deutliche Expressionssteigerung der COX-2 auftritt, sodass diese als konstanter Versuchsparameter festgelegt werden konnte. Die Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

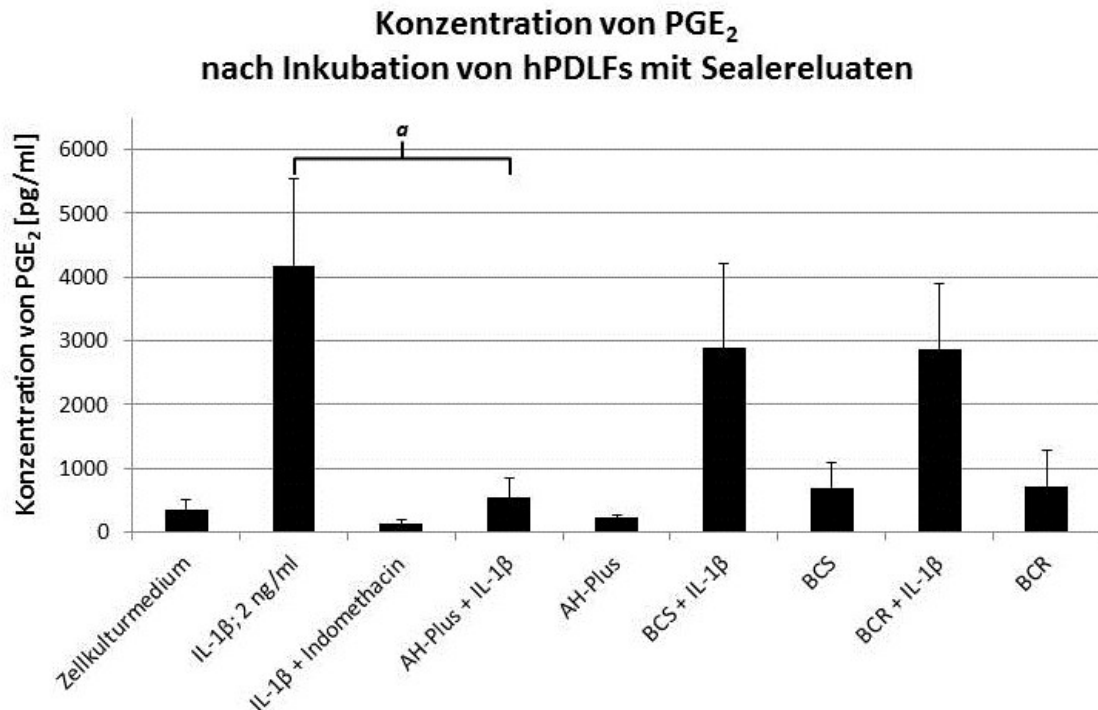


Abbildung 13: Ergebnisse des PGE₂-ELISAs, ^a p < 0,0001 (Tukey-HSD Post-Hoc-Test)

Bereits ohne Stimulation mit IL-1 β und ohne Inkubation mit den Sealereluat war eine geringe Konzentration von PGE₂ vorhanden, die durch Inkubation der hPDLF mit IL-1 β deutlich zunahm, während die Wirkung von Indomethacin die PGE₂-Konzentration senkte (Balken 1-3). Grundsätzlich ist festzuhalten, dass die PGE₂-Konzentration der Zellkulturüberstände bei zusätzlicher Stimulation mit IL-1 β für alle drei untersuchten Sealer deutlich höhere Werte aufwies, als bei alleiniger Inkubation mit den Sealereluat. Zwischen den Zellkulturüberständen, deren Zellen zuvor mit IL-1 β und den Sealereluat inkubiert worden waren, zeigten sich für die drei untersuchten Sealer deutliche Unterschiede. Durch Inkubation mit den Sealereluat von AH plus ergaben sich niedrige PGE₂-Konzentrationen, die mit denen der Negativkontrolle vergleichbar sind (AH plus: 538,8 pg/ml; Negativkontrolle: 346,7 pg/ml), während die Sealereluat der Total Fill Materialien deutlich höhere Werte ergaben, die sich untereinander kaum unterscheiden (Total Fill BCS: 2891,5 pg/ml; Total Fill RRM: 2869,1 pg/ml). Die Konzentrationen an PGE₂, die nach Stimulation mit den Sealereluat alleine resultierten, wiesen durchweg geringere Werte auf als bei zusätzlicher Stimulation mit IL-1 β . Für AH plus ergaben sich nur geringfügig höhere Werte der PGE₂-

Konzentration als für Indomethacin, für die Total Fill Materialien dagegen überstiegen die Werte die der Negativkontrolle und waren wiederum im Vergleich miteinander fast identisch (Total Fill BCS: 700,7 pg/ml; Total Fill RRM: 713,6 pg/ml). Dies bestätigte auch die univariate Varianzanalyse mit folgendem Tukey-HSD Post-Hoc-Test: Die Konzentration zwischen der Positivkontrolle und der stimulierten AH plus Probe unterschieden sich signifikant ($p < 0,0001$).

4.2.2 ELISA auf IL-6

In einem Vorversuch wurde zunächst getestet mit welcher $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentration die hPDLF stimuliert werden müssen, um einen ausreichenden Anstieg der IL-6-Konzentration herbeizuführen. Dabei ergab sich eine Konzentration von 25 U/ml. Abbildung 14 präsentiert die Ergebnisse als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

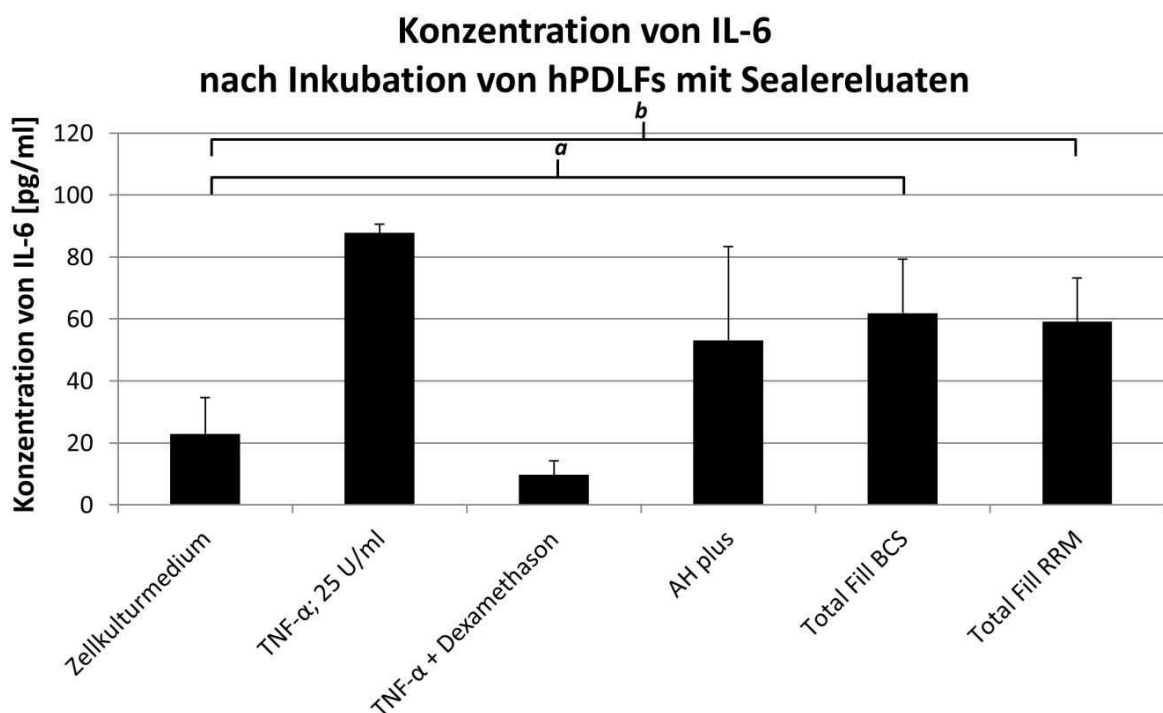


Abbildung 14: Ergebnisse des IL-6 ELISAs, ^a $p = 0,034$; ^b $p = 0,046$ (LSD Post-Hoc-Test)

Es ist ersichtlich, dass bereits ohne Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ eine geringe IL-6 Grundaktivität vorhanden war. Diese wurde durch die alleinige Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ deutlich gesteigert. Folgte auf diese Stimulation jedoch eine 24-stündige Inkubation mit Dexamethason nahm die IL-6-Konzentration auf einen Wert, der kleiner als die Grundaktivität ist, ab (Balken 1-3). Sealereluate von Total Fill BCS

und Total Fill RRM zeigten signifikant (siehe Abbildung XXX) erhöhte IL-6-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle, was auf eine Aktivierung von Entzündungsmechanismen durch in diesen Sealern enthaltene Substanzen hindeuten könnte. Die Werte für die drei Sealer unterschieden sich allerdings nicht signifikant voneinander.

4.2.3 Western Blot auf $\kappa B\alpha$

Ergänzend zu den Ergebnissen der Endproduktassays wurden zur Beurteilung des Einflusses der Sealer auf das Entzündungsgeschehen Western Blot-Analysen auf $\kappa B\alpha$ durchgeführt. Einen für die drei Versuchsreihen repräsentativen Western Blot zeigt Abbildung 15. Bei gleichmäßiger Proteinladung ist zu erkennen, dass in der nicht stimulierten Probe eine große Menge $\kappa B\alpha$ vorliegt, welches in der stimulierten Probe durch proteasomalen Abbau schnell verschwindet. Keines der drei Materialien zeigte eine erkennbare Hemmung der Aktivierung der NF κ B-Kaskade.

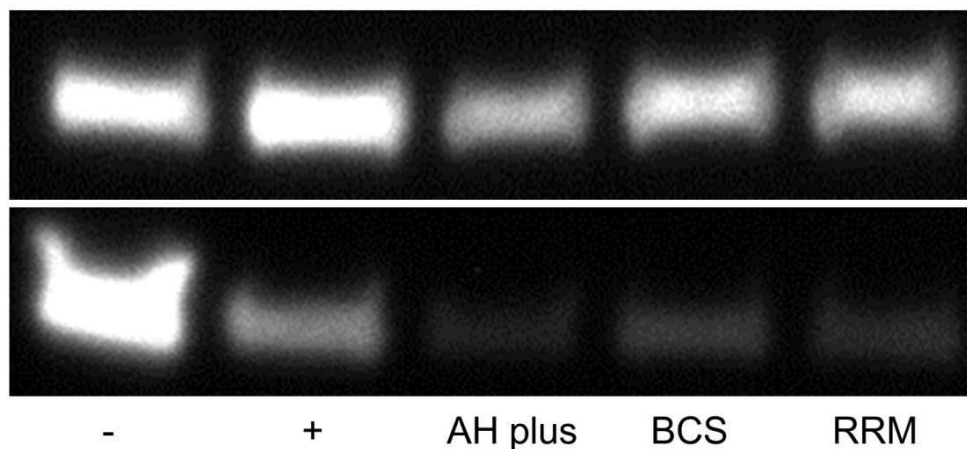


Abbildung 15: repräsentative Western Blot-Analyse auf Actin (oben) und $\kappa B\alpha$ (unten)

4.3 Einfluss auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen

4.3.1 ELISA auf Osteocalcin

Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob die Sealereluate eine osteogene Differenzierung von Stammzellen induzieren besteht darin, die Konzentration von Osteocalcin in Zellkulturüberständen, deren Zellen mit den Sealereluiten inkubiert wurden, zu bestimmen. Für diesen Versuch wurden sowohl PDSC-hTERT, als

auch hMSC benutzt. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den Sealereluaten inkubiert, wobei die von AH plus in einem Verhältnis von 1:1 mit Medium verdünnt wurden, während die anderen unverdünnt verwendet wurden. Danach wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und die Osteocalcin-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Resultate der Versuche werden in Abbildung 16 gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Sealereluaten sowohl bei den PDSC-hTERT, als auch bei den hMSC einen Anstieg der Osteocalcin-Konzentration im Vergleich mit der Negativkontrolle bewirkten. Signifikant war dieser Anstieg bei hMSC für AH plus und Total Fill RRM ($p = 0,002$; $p = 0,016$). Ein besonders deutlicher Anstieg der Osteocalcin-Konzentration konnte bei den PDSC-hTERT für AH plus beobachtet werden (signifikant zur Negativkontrolle, $p = 0,018$). Die Werte von Total Fill BCS und BCR lagen bei den PDSC-hTERT deutlich unter dem von AH plus und unterschieden sich untereinander und von der Negativkontrolle nicht signifikant.

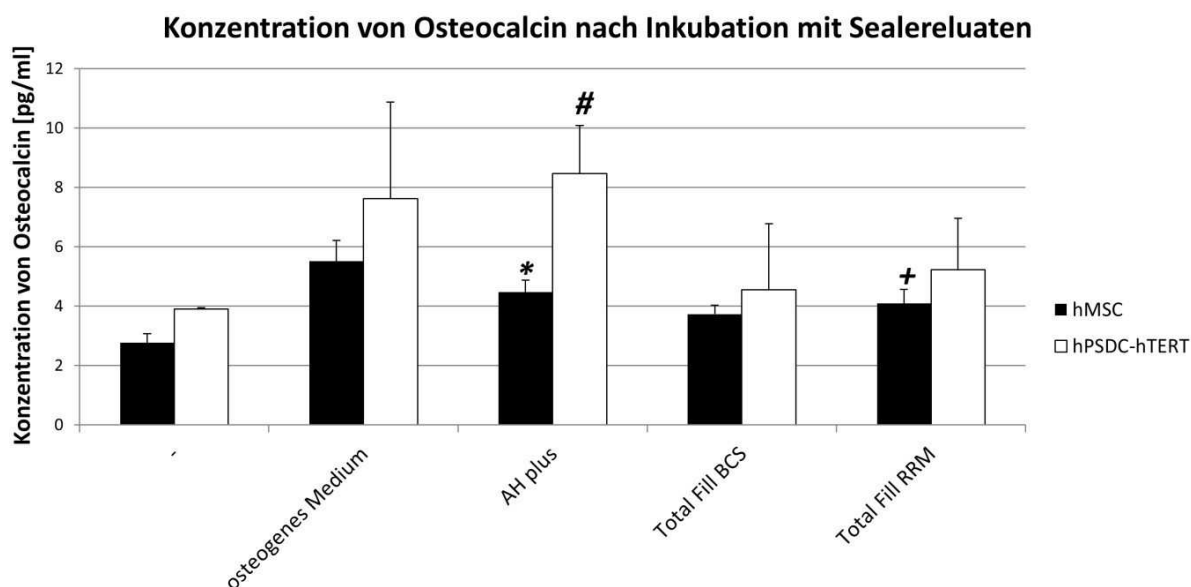


Abbildung 16: Ergebnisse des Osteocalcin-ELISAs bei hMSC und hPDSC-hTERT (* $p = 0,002$; + $p = 0,016$; # $p = 0,018$, LSD Post-Hoc-Test)

4.3.2 Western Blot auf RUNX2

Die folgende Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines Western Blots auf RUNX2 aus drei unabhängigen Versuchsreihen.

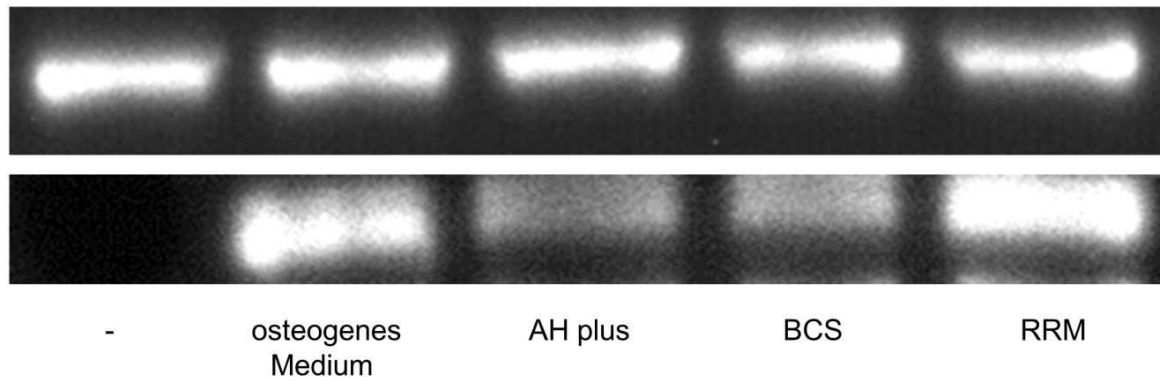


Abbildung 17: Western Blot-Analysen auf Cyclin B (oben) und RUNX2 (unten)

In der Negativkontrolle konnte keine RUNX2 Expression nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die mit osteogenem Medium als Positivkontrolle stimulierte Probe erwartungsgemäß eine deutliche Steigerung der RUNX2 Expression. Total Fill RRM erhöhte die RUNX2 Expression in ähnlichem Maße wie die Positivkontrolle, während AH plus und Total Fill BCS nur eine geringere, wenn auch deutlich sichtbare Zunahme der RUNX2 Expression bewirkten.

4.3.3 Immunzytochemische Untersuchungen

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigten alle Materialien eine Erhöhung der osteogenen Marker Fibronectin und Osteonectin bei typischem Verteilungsmuster. Die folgenden Bilder (Abbildungen 18 und 19) sind beispielhafte Abbildungen für die Kontroll-Antikörper Actin und Lamin B2 sowie für Fibronectin und Osteonectin nach Inkubation mit AH plus, Total Fill BCS und Total Fill RRM.

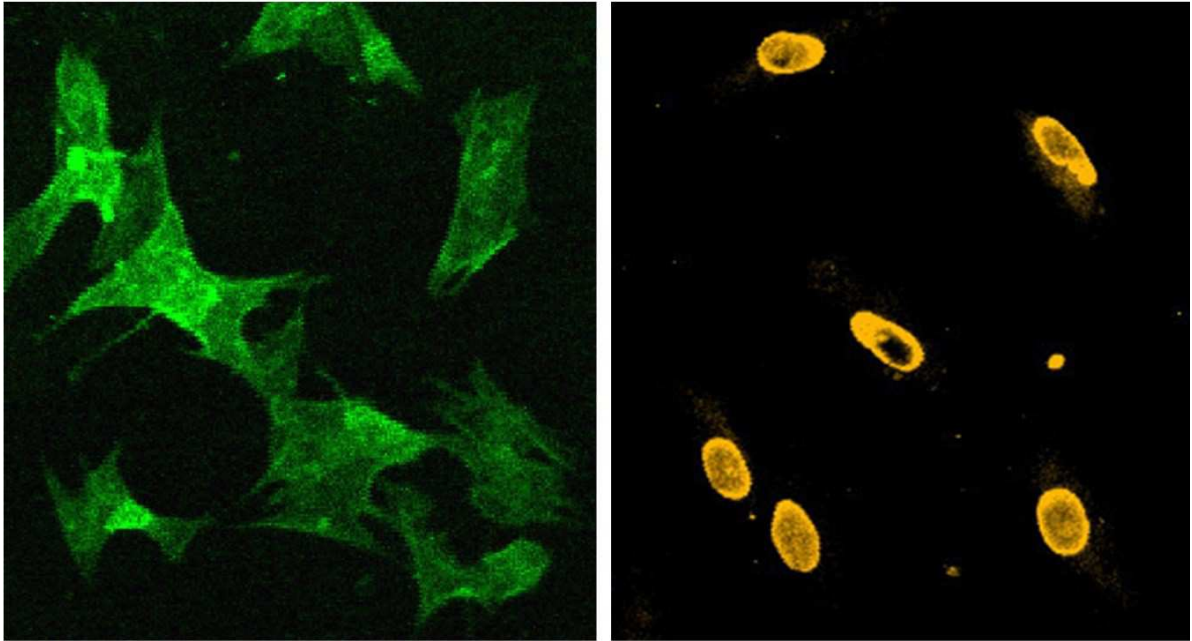


Abbildung 18: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (links Actin, rechts Lamin B2)

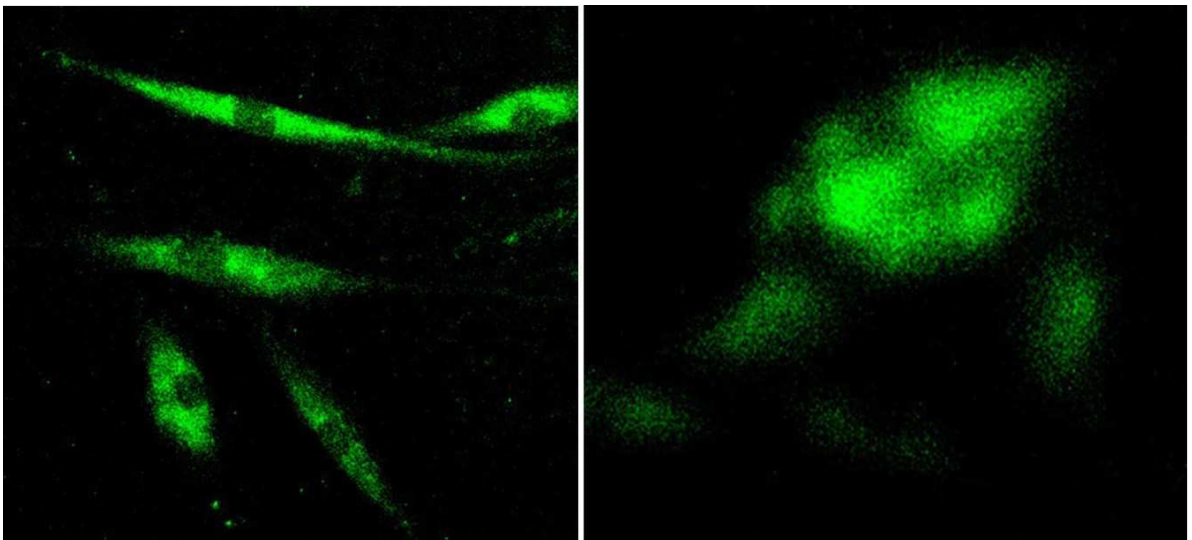


Abbildung 19: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (links Fibronectin, rechts Osteonectin)

5 Diskussion

Grundsätzlich ist anzunehmen, dass sich zelluläre Reaktionen menschlicher Zellen im Vergleich mit tierischen Zellen besser auf eine humane in-vivo Situation übertragen lassen. Deshalb wurden die Untersuchungen dieser Studie nur an humanen Zellen durchgeführt.

Das gesunde Parodontium enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen. Darunter befinden sich unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen, Malassez'sche Epithelzellen, sensorische Zellen und Knochen assoziierte Zellen (Beertesen *et al.*, 1997). Der dominierende Zelltyp in diesem Milieu ist aber der für die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix verantwortliche Fibroblast, der deshalb in die Untersuchungen mit einbezogen wurde (Lekic und McCulloch, 1996). Da sich aber parodontale Ligament Fibroblasten (hPDLF) von den Fibroblasten der Gingiva (HGF-1) in verschiedenen Charakteristika, wie der Proliferationsrate und der Antwort auf Entzündungsmediatoren unterscheiden, wurden in Hinsicht auf möglichst aussagekräftige Ergebnisse beide Zelllinien analysiert (Ogata *et al.*, 1995). Zusätzlich wurden Osteoblasten (hOB) untersucht, da diese als knochenbildende Zellen in Folge der Knochendestruktion bei einer Parodontitis apicalis eine wichtige Rolle für die Regenerationsvorgänge spielen. Des Weiteren kamen Stammzellen zur Anwendung. Die Besonderheit dieser Zellen ist, dass sie sich selbst erneuern und zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können (Pittenger *et al.*, 1999). Dadurch können sie Zellen ersetzen, die durch Krankheit, Trauma oder Alterungsprozesse untergegangen sind (Palermo *et al.*, 2005). Innerhalb des parodontalen Ligaments lassen sich Stammzellnischen abgrenzen, die sich in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen oder in der Nachbarschaft zum Alveolarknochen befinden. Hier kommen unter anderem mesenchymale Stammzellen (hMSC) und Progenitorzellen des parodontalen Ligaments (PDSC-hTERT) vor. Es wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass hMSCs nach Stimulation mit zum Beispiel Dexamethason RUNX2, ein Markergen der osteogenen Differenzierung, verstärkt exprimieren (Zhang *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2005) und eine Applikation mesenchymaler Stammzellen in atrophe Knochendefekte die Knochenheilung verbessert (Funk *et al.*, 2007). Aus

diesen Gründen eignet sich diese Zelllinie sehr gut zur Untersuchung des osteogenen Potentials von bioaktiven Materialien.

Es ist wichtig sich vor Augen zu führen, dass bei korrekter Anwendung der Sealer keine Extrusion in das periapikale Gewebe auftritt. Da aber immer die Gefahr besteht, dass lösliche Substanzen oder Abbauprodukte das periapikale Gewebe erreichen, muss untersucht werden welchen Einfluss die Sealer auf die sich dort befindlichen Zellen haben (Kim und Shin, 2014). Um diesen Auswascheffekt zu simulieren und die in-vivo Situation möglichst naturgetreu zu imitieren wurden in dieser Studie Eluate der drei Sealer hergestellt, denen die Zellen für bestimmte Zeit ausgesetzt wurden. Andere Studien dagegen evaluierten den Einfluss der Sealer, indem sie diese in direkten Kontakt mit den Zellen brachten (Bethany *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014). Dadurch wird die in-vivo Situation nicht korrekt wiedergegeben.

Die Zytotoxizität der Materialien AH plus, Total Fill BCS und -RRM wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Mit Hilfe des WST-8 Tests konnte die Zellviabilität über die Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht werden, das Caspase-Assay diente dagegen zum Nachweis der Apoptoseauslösung.

Die Ergebnisse der WST-8-Untersuchung zeigen, dass die drei untersuchten Materialien grundsätzlich biokompatibel sind, wobei Unterschiede zwischen den verschiedenen Produkten bestehen. Denn AH plus weist überwiegend geringere Zellviabilitäten als Total Fill BCS auf. Dieses Ergebnis stimmt mit den Studien überein, die ebenfalls AH plus mit Total Fill BCS verglichen (Zoufan *et al.*, 2011; Willershausen *et al.*, 2011). Jedoch widersprechen einzelne Studien diesem Ergebnis. In einer 2011 veröffentlichten Studie wird AH plus keine bis nur eine minimale Zytotoxizität bescheinigt, wobei die Zellviabilitäten bis auf eine Ausnahme mit mehr als 90% angegeben werden. Diese Studie beruht allerdings auf Untersuchungen an Maus Fibroblasten (L929). Da diese unter anderem einen heteroploiden Chromosomensatz besitzen, weisen sie andere Mitoseraten, eine andere Wachstumsregulation und vor allem mehr Toleranz gegenüber toxischen Substanzen als die relevanten Zielzellen auf (Eldeniz *et al.*, 2007).

Auch im Vergleich mit Total Fill RRM weist AH plus im Mittel niedrigere Überlebensraten der Zellen auf. Bis heute liegen keine weiteren Studien vor die

diese beiden Materialien miteinander vergleichen, jedoch wurde die Zytotoxizität von Total Fill RRM bereits mehrfach untersucht. Drei Studien, welche jeweils mit Hilfe des MTT-Assays die Zytotoxizität von Total Fill RRM untersuchten, ergaben übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Studie hohe Zellviabilitäten von weitgehend über 90% (Damas *et al.*, 2011; Alanezi *et al.*, 2010) beziehungsweise eine gute Biokompatibilität (Ma Jingzhi *et al.*, 2011). Die aussagekräftigste Studie darunter ist wohl die von Ma Jingzhi und Mitarbeiter, da hier die Reaktion sowohl auf frische und gehärtete Proben, als auch auf unterschiedliche Konzentrationen der Sealereluate an humanen Gingivafibroblasten untersucht wurde, während die anderen beiden Studien die Untersuchungen an menschlichen dermalen Fibroblasten und Maus Fibroblasten (L929) durchführten, wobei es sich um Zellen handelt die in der Regel nicht mit den untersuchten Materialien in Kontakt kommen.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, dass AH plus unverdünnt eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auslöst, die bei Total Fill BCS und RRM ebenfalls beobachtbar ist, jedoch in erheblich geringerem Ausmaß. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass AH plus während der Aushärtung geringe Mengen Formaldehyd freisetzt, das neben mutagenen, karziogenen, und allergisierenden auch zytotoxische Eigenschaften aufweist (Sun *et al.*, 1990; Lewis 1998). Aber auch der Bisphenol-A-diglycidylether, welcher in der flüssigen Phase enthalten ist, kommt als Ursache in Frage (Schweikl *et al.*, 1995). Diese Abnahme der Überlebensrate der Zellen nach Exposition gegenüber unverdünnten Proben wurde bereits in anderen Studien gezeigt (Camargo *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). Jedoch zeigen die Ergebnisse von Camargo und Mitarbeiter eine deutlich höhere Zytotoxizität von AH plus aufgrund einer sehr starken Abnahme der Zellviabilität auf fast 0% nach Exposition der Zellen gegenüber unverdünnten Proben. Die Gründe für diese Diskrepanz liegen möglicherweise in der verwendeten Zellart oder der Methode zur Untersuchung der Zytotoxizität. Denn in dieser Studie wurden chinesische Hamster Fibroblasten (V79) verwendet, deren Überleben im Rahmen eines MTT-Assay untersucht wurde. Der MTT-Assay weist gegenüber dem WST-8-Assay Limitationen auf, denn diese Methode zur Untersuchung der Zellviabilität zeigt einerseits eine geringere Detektionssensitivität (Riss *et al.*, 2011), andererseits setzt die

Durchführung eine Lyse der Zellen voraus. Denn das Prinzip dieses Assays besteht darin, dass der wasserlösliche Farbstoff MTT zu einem wasserunlöslichen Formazan reduziert wird, das nicht membrangängig ist und in den proliferierenden, ungeschädigten Zellen akkumuliert. Erst nach Lyse der Zellen kann das Formazan photometrisch gemessen werden (Gerlier und Thomasset, 1986; Mosmann, 1983). Das bedeutet, dass im Folgenden keine weiteren Messungen möglich sind. Der WST-8-Assay weist dagegen keine Toxizität gegenüber Zellen auf und ermöglicht somit kontinuierliche Zellkulturen (Stoddart, 2011).

Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit der Zellviabilität von der jeweils untersuchten Zellart gezeigt werden. Die humanen Gingivafibroblasten zeigten insgesamt die niedrigsten Zellviabilitäten, und reagierten am empfindlichsten gegenüber den getesteten Materialien. Die Ursachen für die Zellabhängigkeit der Überlebensraten sind in den unterschiedlichen biologischen und funktionellen Eigenschaften der einzelnen Zellarten zu finden (Somerman *et al.*, 1988). Das hat zur Folge, dass die Sensitivität der Zellarten gegenüber den dentalen Materialien je nach verwendeter Assay-Technik variiert (Hentsen-Pettersen und Helgeland, 1981).

Um die Biokompatibilität der Sealer mit einer weiteren Methode neben dem WST-8-Test zu bestimmen, wurde die Induktion der Apoptose durch diese untersucht. Grundsätzlich können Zellen durch Apoptose oder Nekrose zu Grunde gehen. Welchen dieser beiden Wege eine Zelle einschlägt ist von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der Dauer und der Intensität der Einwirkung einer schädigenden Substanz, abhängig. Möglicherweise wird der nekrotische Zelltod durch extrem hohen Stress ausgelöst, der das Apoptoseprogramm überfordert, während der apoptotische Zelltod eher Folge von mildereren Einflüssen ist (Saikumar *et al.*, 1999). Die Apoptose ist die physiologische Form des Zelltods, bei dem sich die Zelle durch einen aktiven Prozess als Antwort auf physiologische oder pathologische Stimuli selbst abschaltet. Zu den pathologischen Stimuli gehören unter anderem ionisierende Strahlen, osmotischer Schock und DNA-schädigende Chemikalien (Jarpe *et al.*, 1998). Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einer Aktivierung von verschiedenen Cystein-Aspartat-Proteasen, den sogenannten Caspasen. In dieser Studie wurde die Aktivität der Capsase-3,

welche ein Schlüsselenzym bei der Durchführung der Apoptose des extrinsischen Weges darstellt, untersucht (Stennicke und Salvesen, 1998).

Bemerkenswert an den Ergebnissen dieser Studie ist, dass auch in der unbehandelten Kontrolle eine gewisse Grundaktivität der Caspase-3 gemessen wurde. Das bedeutet, dass auch ohne äußeren Einfluss, wenige Zellen (hPDLF) spontan die Apoptose durchlaufen. Die Caspase-Aktivität der Zellen, die den Sealereluaten ausgesetzt waren, ist gegenüber dieser Grundaktivität jedoch erhöht. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Sealereluate apoptotische Prozesse in den parodontalen Ligament Fibroblasten (hPDLF) induzieren. Da die Erhöhung der Caspase-3-Aktivität jedoch nur geringfügig ist, können alle drei untersuchten Sealer als biokompatibel eingestuft werden. Im Zusammenhang mit diesem Resultat muss aber auch beachtet werden, dass die Zellen, die den Weg des nekrotischen Zelltods einschlagen, hier nicht berücksichtigt werden, da die Nekrose nicht durch eine erhöhte Aktivität der Caspasen gekennzeichnet ist.

Bis heute existieren nur wenige Veröffentlichungen, welche ebenfalls die Apoptoseinduktion durch Sealer untersuchen und zudem befindet sich unter diesen keine Studie, die einen der hier analysierten Sealer betrachtete (Yu *et al.*, 2010; Baraba *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015; Al-Awadhi *et al.*, 2004). Zu den analysierten Sealern gehören unter anderen Roekoseal (Roeko, Langenau, Deutschland), Epiphany (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT, USA) und AH 26 (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland). Zwar stellten alle genannten Studien ebenfalls erhöhte Apoptoseraten durch den Einfluss des jeweiligen Sealers fest, dennoch sollten die Ergebnisse aufgrund der variierenden Versuchsparameter nicht miteinander verglichen werden. Beispielsweise wurden in keiner der genannten Veröffentlichungen relevante Zielzellen benutzt, sondern unter anderem Osteoblasten der Schädelkalotte von Ratten oder Maus-Osteoblasten (MC-3T3-E1).

Um zu beurteilen wie hoch das Risiko für Schäden am genetischen Material der mit den Sealern in Berührung kommenden Zellen ist, wurde ein Mikronukleus Assay durchgeführt. Während AH plus die Mikronukleus Formation gegenüber der Negativkontrolle leicht erhöhte und somit ein geringe Genotoxizität nachweisbar war, konnte diese für die beiden Total Fill Materialien nicht festgestellt werden. Bis

heute liegen keine Vergleichsstudien zur Genotoxizitätsuntersuchung von Total Fill RRM vor. AH plus wurde jedoch bereits in anderen Studien mittels Mikronukleus Assay auf eine mögliche Genotoxizität untersucht (Bin *et al.*, 2012; Camargo *et al.*, 2009). Beide genannten Studien stellten für AH plus eine geringfügige Erhöhung der Mikronukleus Raten gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe fest und stimmen somit sehr gut mit den Resultaten dieser Untersuchung überein. Diese Ergebnisse können wahrscheinlich auf die minimale Freisetzung verschiedener gentoxischer Substanzen aus AH plus zurückgeführt werden. Dazu zählen sowohl Formaldehyd als auch der im Epoxidharz enthaltene Bisphenol-A-diglycidylether (Cohen *et al.*, 1998, Miletic *et al.*, 2005). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2015 verglich die Formation von Mikronuklei durch den Kontakt von humanen Gingivafibroblasten mit AH plus und Total Fill BCS (Candeiro *et al.*, 2015). Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Untersuchung wurde auch hier eine Erhöhung der Mikronukleus Raten gegenüber der Negativkontrolle durch den Sealer AH plus festgestellt. Jedoch führte auch die Inkubation der Zellen mit dem Total Fill BCS zu einem geringfügig erhöhten Anteil der Mikronuklei. Dieses Resultat stimmt nicht mit der hier vorliegenden Studie überein. Außerdem stellten Candeiro und Mitarbeiter im allgemeinen höhere Mikronukleus Raten fest. So betrug der prozentuale Mikronukleus Anteil für AH plus etwa 8% und für Total Fill BCS 2,5%. Diese Differenzen sind auf abweichende Versuchsparameter zurückzuführen.

Da ein wichtiges Ziel der endodontischen Therapie in der Förderung der Heilung einer möglichen Entzündung im periapikalen Gewebe besteht, ist es von großer Bedeutung den Einfluss der Sealer auf diese Vorgänge zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden sowohl ein ELISA auf IL-6 und ein EIA PGE₂ als auch Western Blots auf $\text{ikB}\alpha$ durchgeführt. Mit Hilfe der ELISAs/EIAs auf IL-6 und PGE₂ wurden jeweils zwei Fragestellungen diskutiert: Einerseits wurde der Einfluss der Sealer auf eine bereits vorhandene Entzündung erforscht, andererseits wurde untersucht, ob die Sealer die Entwicklung einer Entzündungsreaktion begünstigen.

Eine vorliegende Entzündungsreaktion wurde im PGE₂-EIA simuliert, indem die hPDLF mit IL-1 β stimuliert wurden. IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine wichtige Rolle in der entzündlichen Antwort spielt. Es führt zu einer erhöhten

Aktivität der Cyclooxygenase und damit zu einer verstärkten Bildung von PGE_2 (Chang *et al.*, 2006). Um die IL-6-Konzentration im Zellüberstand zu erhöhen und somit auch im IL-6-ELISA eine vorliegende Entzündung nachzuahmen, wurden die hPDLF vor der Inkubation mit den Sealereluaten mit $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert. Beim Tumornekrosefaktor- α handelt es sich wie beim IL-1 β ebenfalls um ein proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem an der Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung weiterer Zytokine, wie dem IL-6, beteiligt ist (Goetz *et al.*, 2004). Nach der Stimulation mit IL-1 β und Inkubation mit den Sealereluaten ergab sich im PGE_2 -EIA für AH plus eine deutlich geringere PGE_2 -Konzentration, als für die Total Fill Materialien. Diese Beobachtung kann einerseits auf eine eventuell verringerte Aktivität der Cyclooxygenase und damit Bildung von PGE_2 zurückgeführt werden, andererseits aber auch auf die bereits im WST-8 und Caspase-Assay nachgewiesenen zytotoxischen Eigenschaften von AH plus. Denn nur lebende Zellen können PGE_2 bilden. Die Ergebnisse des IL-6-ELISAs zeigten ebenfalls für AH plus die geringsten IL-6-Konzentrationen im Vergleich mit den anderen untersuchten Materialien. Um in diesem Versuch die zytotoxischen Eigenschaften von AH plus weitestgehend auszuschalten, wurden die Eluate von AH plus im Verhältnis 1:1 mit Medium verdünnt. AH plus bewirkt demnach offensichtlich eine geringere Ausschüttung von IL-6 als die Total Fill BC Materialien bei simulierten Entzündungen. Auffällig an den Ergebnissen des IL-6-ELISAs ist, dass der Wert der Positivkontrolle bei der Untersuchung des Einflusses der Sealer auf eine bereits vorherrschende Entzündung bei allen drei Sealern deutlich überschritten wurde. Dies ist auf additive Effekte, die durch die Wirkungen von $\text{TNF-}\alpha$ und den Sealereluaten auftreten, zurückzuführen. Da kaum Studien vorliegen, die ebenfalls eine vorherrschende Entzündungsreaktion simulierten und den Einfluss der Sealer darauf untersuchten, ist es schwierig die hier ermittelten Resultate zu vergleichen und einzuordnen. Im Jahr 2011 wurde jedoch eine Studie veröffentlicht, der eine ähnliche Fragestellung zu Grunde liegt (Brackett *et al.*, 2011). Die vorliegende Entzündungsreaktion wurde hier durch die Stimulation der Zellen mit LPS statt mit IL-1 β beziehungsweise $\text{TNF-}\alpha$ durchgeführt. Es ergab sich bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS und Inkubation mit dem Sealer AH plus eine Abnahme der IL-6-Konzentration im Vergleich mit der Positivkontrolle, bei der die Zellen nur mit

LPS stimuliert wurden. Dieses Resultat stimmt nicht mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie überein. Zusätzlich stellten Brackett und Mitarbeiter eine Zunahme der TNF- α -Konzentration unter den gleichen Bedingungen fest. Da TNF α die IL-6 Freisetzung fördert erscheint dieses Ergebnis widersprüchlich. Als Ursachen für die Abweichung der Ergebnisse sind die unterschiedlichen Materialien und Methoden denkbar. Es wurden humane Monozyten verwendet, die für 72 Stunden in direkten Kontakt mit den 12 Wochen lang in PBS gelagerten Sealerproben gebracht wurden. Des Weiteren wurden die Zytokinkonzentrationen nicht mittels ELISA untersucht, sondern mit dem Odyssey Infrarot Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Ohne eine vorherige Stimulation der hPDLF mit proinflammatorischen Substanzen konnte festgestellt werden, ob die drei untersuchten Sealer die Auslösung einer Entzündungsreaktion fördern. Auch hier ergab sich sowohl im PGE₂-EIA, als auch im IL-6-ELISA für AH plus im Vergleich mit Total Fill BCS und RRM die geringste PGE₂- beziehungsweise IL-6-Konzentration, die für PGE₂ sogar geringfügig unter dem Wert der Negativkontrolle lag. Dies ist wiederum vor allem auf die zytotoxischen Eigenschaften von AH plus zurückzuführen. Die Materialien Total Fill BCS und RRM unterschieden sich untereinander in den IL-6- und auch in den PGE₂-Konzentrationen jeweils nur geringfügig und übertrafen zudem jeweils deutlich den Wert der Negativkontrolle. Das bedeutet, dass es trotz der geringen zytotoxischen Eigenschaften der unverdünnten Total Fill BCS und RRM Eluate und der damit einhergehenden Abnahme der Zellviabilität zu einer erhöhten Aktivität der COX mit verstärkter PGE₂-Bildung gegenüber den nur mit Medium inkubierten Zellen kommt. Dies gilt auch für die vermehrte Freisetzung von IL-6. Zusammenfassend ist für diesen Versuchsteil festzustellen, dass alle drei untersuchten Sealer die Freisetzung von IL-6 und PGE₂ steigern. Als Ausnahme ist nur die PGE₂-Freisetzung bei AH plus zu nennen, die vermutlich auf den zytotoxischen Eigenschaften dieses Sealers beruht.

Bereits in mehreren Studien wurde der Einfluss von AH plus auf die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren untersucht. Die verstärkte Bildung von IL-6 nach Inkubation von Zellen mit den Eluaten von AH plus wurde in anderen Studien ebenfalls festgestellt (Huang *et al.*, 2005; Brackett *et al.*, 2011). In der 2005

veröffentlichten Studie von Huang und Mitarbeiter wurde an humanen Osteoblasten (U2OS) mittels semi-quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) eine gesteigerte IL-6 und auch Interleukin-8 (IL-8) mRNA Gen-Expression nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten Brackett und Mitarbeiter, dass unter dem Einfluss von AH plus die Sekretion von 41 aus insgesamt 42 untersuchten Zytokinen um mindestens 20% zunimmt und bei einem Drittel der Zytokine sogar ein Konzentrationsanstieg um mehr als 100% auftritt. Unter den analysierten Zytokinen befand sich auch das IL-6. Es liegen keine Studien vor, die die PGE₂-Konzentration nach Inkubation der Zellen mit einem der drei untersuchten Sealereluatn bestimmten. Jedoch ergab eine 2013 veröffentlichte Studie, dass unter dem Einfluss von AH plus die Bildung der COX und die IL-1 β Produktion zunimmt (Kim *et al.*, 2013). Da das Prostaglandin E₂ von der Cyclooxygenase gebildet wird, kann gefolgert werden, dass auch erhöhte PGE₂-Konzentration gemessen werden hätten können. Diese Steigerung der PGE₂-Konzentration widerspricht zwar auf den ersten Blick den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie, es muss aber beachtet werden, dass sich die Materialien und Methoden der beiden Studien unterscheiden. Kim und Kollegen führten die Untersuchungen an Maus Osteoblasten (MC-3T3 E1) durch, die anders als humane Zellen auf die Sealereluate reagieren, und verdünnten die frischen Sealer bei der Herstellung der Eluate mit 30 ml Zellkulturmedium, während in der hier vorliegenden Studie hPDLF verwendet wurden und die für 24 Stunden gehärteten Sealer mit nur 4 ml Medium verdünnt wurden. Durch die starke Verdünnung der Sealer konnten möglicherweise die zytotoxischen Eigenschaften von AH plus ausgeschaltet werden, wodurch es zu dieser Abweichung der Ergebnisse kommt. Eine weitere Studie untersuchte nach Inkubation der Zellen mit AH plus die Konzentration von IL-1 β , einem Stimulator der COX und damit der PGE₂-Bildung. Hier wurde wie in der vorliegenden Studie eine Reduktion der IL-1 β -Produktion festgestellt, die der Autor aber ebenfalls auf die zytotoxischen Eigenschaften von AH plus zurückzuführt (Brackett *et al.*, 2009). Aufgrund der sich erst seit kurzem auf dem Markt befindenden Total Fill Materialien mangelt es an Studien, die den Einfluss dieser auf die Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen erforschten. Bis zuletzt existierte nur eine Veröffentlichung, die die Zytokin Produktion von humanen Osteoblasten nach Inkubation mit Eluatn des Total Fill

RRM untersuchte (Ciasca *et al.*, 2012). Bis auf einzelne Ausnahmen konnte eine Erhöhung der IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α Expression gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden. Die Resultate sind demnach in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Während die ELISAs den Einfluss der drei untersuchten Materialien auf eine vorhandene Entzündungsreaktion quantitativ aufzeigten, sollte mit der Western Blot Analyse auf $\kappa B\alpha$ ergänzend eine qualitative Beurteilung stattfinden. Durch die Stimulation der hPDLF mit TNF- α und Inkubation mit den Sealereluaten sollte wie bei den ELISAs der Einfluss der drei untersuchten Materialien auf eine vorliegende Entzündungsreaktion simuliert werden. Bereits durch alleinige Stimulation mit TNF- α verringerte sich die $\kappa B\alpha$ Expression erwartungsgemäß. Eine weitere Abnahme resultierte nach Inkubation der hPDLF mit dem jeweiligen Sealereluat. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass alle drei untersuchten Materialien die Expression $\kappa B\alpha$ abbauender Substanzen fördern, in Folge dessen vermehrt NF- κB in den Zellkern übertritt und damit die Transkription von Genen, welche für proinflammatorische Proteine codieren, verstärkt wird. Dieses Versuchsergebnis steht grundsätzlich mit den Ergebnissen der ELISAs/EIAs auf IL-6 und PGE₂ in Übereinstimmung, wobei als Ausnahme wieder die für AH plus reduzierte PGE₂-Expression erwähnt werden muss. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse für AH plus werden durch eine Studie aus dem Jahr 2013 unterstützt (Kim *et al.*, 2013). Kim und Mitarbeiter führten Western Blot-Analysen auf NF- κB sowohl mit zytosolischen als auch mit nukleären Proteinen durch. Nach Inkubation der Zellen (MC-3T3, Maus Osteoblasten) mit Eluaten des Sealers AH plus konnte eine Abnahme der zytosolischen und eine Zunahme der nukleären NF- κB Expression gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verzeichnet werden. Dieses Resultat entspricht der in dieser Studie nachgewiesenen Verringerung der $\kappa B\alpha$ Expression nach Kontakt der Zellen mit AH plus. Ein für den Vergleich der beiden Studien einschränkender Faktor ist, dass die Maus Osteoblasten nicht mit TNF- α stimuliert wurden. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen keine geeigneten Vergleichsstudien für die Total Fill Materialien vor.

Um die Versuchsergebnisse bewerten zu können, muss sich die Frage gestellt werden welcher Zusammenhang zwischen einer auftretenden

Entzündungsreaktion, die mit einer Knochenresorption einhergeht, und der Knochenheilung besteht. Handelt es sich hierbei um Gegensätze oder sind die beiden Vorgänge miteinander verknüpft?

Im Rahmen einer Parodontitis apicalis, die eine der häufigsten Pulpaerkrankungen darstellt, kommt es dazu, dass Bakterien eine Vielfalt an entzündungsfördernden Substanzen freisetzen. Es werden verschiedene Signalmoleküle und Mediatoren freigesetzt und Entzündungszellen rekrutiert (Nair *et al.*, 1996; Graves und Cochran, 2003). Durch die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine, wie beispielsweise dem IL-1 β , IL-6 und TNF- α , aber auch der Eikosanoide, wie dem PGE₂, wird eine Resorption des periapikalen Knochens ausgelöst. Diese Substanzen sind jedoch genauso für die folgende Regeneration des Knochens notwendig (Liu *et al.*, 2010; Jakab, 2014). Diese ambivalenten Eigenschaften wurden bereits in zahlreichen Studien bestätigt. Das IL-1 β induziert einerseits die Synthese von IL-6 und von Prostaglandinen, andererseits initiiert es den Ablauf einer Reparatur-Kaskade und stimuliert die Kollagensynthese und Angiogenese (Kon *et al.*, 2001). Auch das IL-6 weist ein ambivalentes Verhalten auf. Es führt zu einer Steigerung der Osteoklastogenese (Gorny *et al.*, 2004), fördert aber gleichzeitig die Kallusbildung und -mineralisation (Yang *et al.*, 2007). Des weiteren stellten Nanes und Pacifici fest, dass TNF- α die Differenzierung und regelrechte Funktion der Osteoblasten hemmt (Nanes und Pacifici, 2005), die Knochenheilung bei Mäusen mit geschädigtem TNF- α -Rezeptor zugleich aber verzögert ist (Gerstenfeld *et al.*, 2001). Zuletzt ist das PGE₂ zu nennen. Einerseits stimuliert es die Knochenresorption und die Osteoclastogenese und wirkt somit proresorptiv (Raisz, 1999), andererseits inhibiert es die Funktion der Osteoklasten und weist demnach auch regenerative Eigenschaften auf (Chambers *et al.*, 1999). Abschließend ist festzuhalten, dass Entzündung und Knochenresorption in enger Verbindung mit der Knochenheilung stehen und gewissermaßen Vorläufer von dieser darstellen. Dementsprechend kann eine Erhöhung der Expression von proinflammatorischen Substanzen durch den Einfluss der Sealereleuate grundsätzlich nicht als negative Eigenschaft eines Sealers bewertet werden.

Da ein wesentliches Ziel nach erfolgter endodontischer Behandlung in der Regeneration des entstandenen Knochendefektes besteht, ist es wünschenswert, dass die in die Wurzelkanäle eingebrachten Materialien diesen Prozess unterstützen. Diese Eigenschaft ist besonders für Reparaturen von Wurzelkanalperforationen, Apexifikationen und Pulpaüberkappungen, essentiell, für die das Total Fill RRM freigegeben ist. In Bezug auf diese Fragestellung wurde das Potential der drei Materialien die osteogene Differenzierung von Stammzellen zu fördern, untersucht.

Zum Nachweis der Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten können verschiedene Knochenmatrixproteine wie zum Beispiel Osteopontin, Osteonectin oder alkalische Phosphatase herangezogen werden (Aubin *et al.*, 1995; Christenson, 1997). Da bestimmte Marker (z.B. cbfa1) jedoch sowohl von Osteoblasten, als auch von hMSC exprimiert werden, ermöglichen diese keine Unterscheidung zwischen unreifen und reifen Zellen der osteoblastären Kaskade (Schieker *et al.*, 2004). Osteocalcin dagegen wird nur von reifen Osteoblasten gebildet und stellt somit den klassischen Indikator für die Knochenmineralisation dar (Ducy *et al.*, 2000, Beresford *et al.*, 1993). In ELSIAs auf Osteocalcin konnte nachgewiesen werden, dass alle drei untersuchten Materialien (AH plus, Total Fill BCS, Total Fill RRM) nach Kontakt mit hMSC und PDSC-hTERT zu einer gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe ähnlich stark erhöhten Osteocalcin Expression führten und somit zu einer Förderung der Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten, welche als Initiatoren des Mineralisationsprozesses für den Knochenumbau verantwortlich sind (Anderson und Reynolds, 1973). Der geringe Nachweis von Osteocalcin in der Negativkontrolle kann dadurch erklärt werden, dass durch alleinige Inkubation der Zellen mit Medium nur ein sehr geringer Anteil der Stammzellen zu Osteoblasten differenziert.

Um das osteogene Potential der drei Materialien nicht nur quantitativ anhand von ELISAs auf Osteocalcin beurteilen zu können, wurden zur qualitativen Bewertung Western Blot Analysen auf den Transkriptionsfaktor RUNX2 durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen weiteren bedeutenden Marker, der die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten reguliert (Komori *et al.*, 2006; Lian *et al.*, 2004). Wichtige Informationen zur Funktion von RUNX2 lieferten Versuche an RUNX2

defizienten Mäusen. In diesen Mäusen fand eine totale Blockade der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten statt und es konnten keine Knochenmatrixproteine gebildet werden (Komori *et al.*, 1997; Mundlos *et al.*, 1997).

Für die Durchführung der Western Blot Analysen auf RUNX2 eigneten sich hPDLF, denn diese Zellen sind an der Osteo- und Zementogenese beteiligt, indem sie Proteine sezernieren, die am Knochenaufbau beteiligt sind (Jönsson *et al.*, 2011; Somerman *et al.*, 1990). Die Expression von RUNX2 in den hPDLF wurde durch AH plus und Total Fill BCS gegenüber der Negativkontrolle nur geringfügig gesteigert. Total Fill RRM dagegen erhöhte die RUNX2 Expression ähnlich stark wie die Positivkontrolle. Daraus kann gefolgert werden, dass das Total Fill RRM ein höheres Potential zur Förderung der osteogenen Differenzierung von Stammzellen aufweist, als Total Fill BCS und AH plus. Aus welchem Grund sich Total Fill BCS und RRM hinsichtlich dieses Aspekts derart stark unterscheiden, ist schwierig zu beurteilen. Ein möglicher Faktor kann eine voneinander abweichende Löslichkeit sein. Auch minimale Unterschiede in der Zusammensetzung können als Erklärung herangezogen werden. So enthält nur das Total Fill RRM Tantalum pentoxid. Diese Substanz wird unter anderem für die Oberflächenbeschichtung von Implantaten genutzt und soll ein osteoinduktives Potential haben (Wang *et al.*, 2012; Stiehler *et al.*, 2008). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten keine Studien ausfindig gemacht werden, welche durch die Verwendung ähnlicher Materialien und Methoden einen direkten Vergleich der Ergebnisse zur osteogenen Differenzierung von Stammzellen erlaubt hätten. Grundsätzlich bestätigen aber verschiedene Untersuchungen zu den Total Fill Materialien deren Potential die Knochenregeneration zu fördern (Zhang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2014; Shokouhinejad *et al.*, 2012; Güven *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2016). Zhang und Mitarbeiter stellten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion fest, dass Total Fill BCS in Osteosarkomzellen eine gesteigerte Expression von Osteocalcin mRNA auslöst (Zhang *et al.*, 2010). Auch Chang untersuchte den Total Fill BCS. In hPDLF erhöhte es die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, und steigerte die Expression von osteoblastären Markerproteinen sowie von RUNX2 (Chang *et al.*, 2014). In einer 2016 veröffentlichten Studie wurde die Wirkung von Total Fill RRM an dentalen Pulpazellen untersucht. Sowohl die Expression des Enzyms

alkalische Phosphatase, als auch die Sekretion des vaskular endothelial growth factor (VEGF) stieg unter dem Einfluss von Total Fill RRM an. Machado und Mitarbeiter folgerten daraus, dass Total Fill RRM die pulpale Heilung und die Bildung von Dentinbrücken fördert (Machado *et al.*, 2016).

6 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die neu auf dem Markt eingeführten Produkte Total Fill BC Sealer und Root Repair Material untersucht und mit dem klinisch bewährten Sealer AH plus verglichen. Sealer werden im Rahmen endodontischer Behandlungen benutzt, um eine randständige und dichte Wurzelkanalfüllung zu erzielen, Reparaturmaterialien dagegen werden zur erfolgreichen Therapie von Wurzelkanalperforationen, Pulpaüberkappungen oder retrograden Wurzelkanalfüllungen verwendet. Dabei müssen sowohl die Sealer, als auch die Reparaturmaterialien bestimmten Anforderungen entsprechen, wovon drei Aspekte in dieser Studie genauer untersucht wurden.

Die Versuche wurden ausschließlich an humanen ausgereiften Zellen (hPDLF, HGF-1, hOB) und humanen Stammzellen (hMSC, PDSC-hTERT) durchgeführt. Zur Herstellung der Sealereluate wurden Sealerproben 24 Stunden ausgehärtet (37° C, 100% Luftfeuchtigkeit), im Anschluss mit 4 ml Medium bedeckt und nach weiteren 24 Stunden zweimal filtriert. Alle Versuche wurden insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Zunächst wurde eine mögliche zytotoxische und genotoxische Wirkung der Sealereluate auf die Zellen untersucht. Während die Zytotoxizität mittels WST-8 und Caspase-Assay beurteilt wurde, diente der Mikronukleus-Assay der Analyse der Genotoxizität. Darüber hinaus konnte der Einfluss der drei Materialien auf ein Entzündungsgeschehen durch den Nachweis von PGE₂ und IL-6 mittels ELISA/EIA und von κ B α mittels Western Blot-Analyse geprüft werden. Schließlich wurde eine Beeinflussung der osteogenen Differenzierung von Stammzellen durch Sealer ermittelt. Dieser Gesichtspunkt umfasste ELISAs auf Osteocalcin, Western Blot Analysen auf RUNX2 sowie immunzytochemische Untersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass AH plus gegenüber den Total Fill Materialien die höchste Zytotoxizität aufweist. Denn die Überlebensraten der Zellen waren nach Inkubation dieser mit AH plus durchschnittlich am niedrigsten und die Caspase-Aktivität am höchsten. Da AH plus darüber hinaus zu einer geringfügigen Steigerung der Mikronukleus Raten führte, weist dieses Material eine minimale Genotoxizität auf. Der Total Fill BC Sealer und das RRM zeigen dagegen keine genotoxischen Eigenschaften.

Alle drei Produkte steigerten die Freisetzung von IL-6 und PGE₂ und verringerten die Expression von $\text{ikB}\alpha$ in ähnlichem Maße. Des Weiteren wurde die Bildung von Osteocalcin durch alle drei Materialien erhöht. Die Expression von RUNX2 erhöhte sich ebenfalls durch den Einfluss der einzelnen Sealereluate, jedoch bewirkten AH plus und Total Fill BCS nur geringfügige, Total Fill RRM allerdings erhebliche Steigerungen der RUNX2 Bildung.

Die Total Fill Materialien zeichnen sich gegenüber AH plus durch eine höhere Biokompatibilität aus. Die erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Substanzen durch den Einfluss der Total Fill Materialien scheint zwar auf den ersten Blick eine Ursache für die Auslösung beziehungsweise Steigerung einer periapikalen Entzündungsreaktion zu sein, jedoch korreliert das entzündliche Geschehen sehr eng mit der Gewebeheilung und stellt gewissermaßen die Voraussetzung für eine einsetzende Regeneration des Gewebes dar. Dementsprechend darf dieser Gesichtspunkt nicht als nachteilige Eigenschaft interpretiert werden. Beide Total Fill Materialien fördern die osteogene Differenzierung von Stammzellen. Das Total Fill RRM, für dessen Indikationsbereich diese Eigenschaft von besonderer Bedeutung ist, sticht diesbezüglich besonders positiv hervor.

Diese Studie leistet einen Beitrag zur Beurteilung der Eigenschaften des Total Fill BC Sealer und des Total Fill Root Repair Material. Um jedoch die Ergebnisse dieser Studie einordnen und die Produkte detaillierter beurteilen zu können, sind weiterführende Studien notwendig, welche die Materialeigenschaften sowohl mittels in-vitro-, als auch in-vivo- Untersuchungen analysieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T. Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6. *Ciba Found Symp*, 1992: 167:47-62.
2. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010: 109:122-5.
3. Al-Awadhi S, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod*, 2004: 30:527-33.
4. Allan NA, Walton RC, Schaeffer MA. Setting times for endodontic sealers under clinical usage and in vitro conditions. *J Endod*, 2001:27:421-3.
5. al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*, 1995: 343:121-35.
6. Anderson HC, Reynolds JJ. Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Dev Biol*, 1973: 34:211-27.
7. Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol*, 1990:94:101-107.
8. Artese L, Piattelli A, Quaranta M, Colasante A, Musani P. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod*, 1991:17:483-7.
9. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2005:31:101-3.
10. Athanassiadis B, George GA, Abbott PV, Wash LJ. A review of the effects of formaldehyd release from endodontic materials. *Int Endod J*, 2014:48:829-38.
11. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 1995: 17:77-83.
12. Baldini G, Ponti C, Bortul R, Narducci P, Grill V, Martelli AM. Sparc localizes to the blebs of hOB cells and human primary osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2008: 104:2310-23.
13. Baraba A, Zelježić D, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *Int Endod J*, 2011: 44:652-61.
14. Baumann, MA. Obturation des Wurzelkanalsystems. *Quintessenz*. 2005.
15. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*, 1997: 13:20-40.
16. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRootMTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod*, 2007:33:1231-4.
17. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am J Med Genet*, 1993: 45:163-78.
18. Bergenholtz G, Mjör IA, Cotton WR, Hanks CT, Kim S, Torneck CD, Trowbridge HO. The biology of dentin and pulp. Consensus report. *J Dent Res*, 1985:64:631-3.

19. Bergenholtz G, Warfvinge J. Migration of leukocytes in dental pulp in response to plaque bacteria. *Scand J Dent Res*, 1982; 90:354-62.
20. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2012; 38:495-500.
21. Blum JY, Machtou P, Micallef JP. Analysis of forces developed during obturations. Wedging effect: Part II. *J Endod*, 1998; 24:223-8.
22. Bodrumlu, E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J*, 2008; 34:30-5.
23. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res*, 2004; 83:408-13.
24. Brackett MG, Lewis JB, Messer RL, Lei L, Lockwood PE, Wataha JC. Dysregulation of monocytic cytokine secretion by endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011; 97:49-57.
25. Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, Wataha JC.
26. Brasier, AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol*, 2006; 6:111-30.
27. Butt N, Talwar S, Chaudhry S, Nawal RR, Yadav S, Bali A. Comparison of physical and mechanical properties of mineral trioxide aggregate and Biodentine. *Indian J Dent Res*, 2014; 25:692-7.
28. Camargo CH, Camargo SE, Valera MC, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009; 108:952-60.
29. Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod*, 2014; 40:530-3.
30. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*, 2005; 21:297-303.
31. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*, 2006; 39:747-54.
32. Canatore. Root canal obturation and root integrity. *Endodontic Practice*, 2006.
33. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J Endod*, 2012; 38:842-5.
34. Candeiro GT, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto RS, Azambuja-Júnior N, Marques MM, Cai S, Gavini G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *Int Endod J*, 2015: online published.
35. Casanova, F. Understanding of some clinically significant physical properties of Kerr Sealer through investigation. *Master Thesis*, 1975.
36. Chambers TJ, Fox S, Jagger CJ, Lean JM, Chow JW. The role of prostaglandins and nitric oxide in the response of bone to mechanical forces. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999; 7:422-3.

37. Chandrasekhar V, Morishetty PK, Metla SL, Raju RV. Expansion of Gutta-percha in Contact with Various Concentrations of Zinc Oxide–Eugenol Sealer: A Three-dimensional Volumetric Study. *J Endod*, 2011:37:697-700.
38. Chang MC, Chen YJ, Tai TF, Tai MR, Li MY, Tsai YL, Lan WH, Wang YL, Jeng JH. Cytokine-induced prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 expression in dental pulp cells: downstream calcium signalling via activation of prostaglandin EP receptor. *Int Endod J*, 2006: 39:819-26.
39. Charland T, Hartwell GR, Hirschberg C, Patel R. An evaluation of setting time of mineral trioxide aggregate and EndoSequence root repair material in the presence of human blood and minimal essential media. *J Endod*, 2013:39:1071-2.
40. Christenson, RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem*, 1997: 30:573-93.
41. Ciasca M, Aminoshariae A, Jin G, Montagnese T, Mickel A. A comparison of the cytotoxicity and proinflammatory cytokine production of EndoSequence root repair material and ProRoot mineral trioxide aggregate in human osteoblast cell culture using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Endod*, 2012:38:486-9.
42. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An In Vitro Study of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers. *J Endod*, 2000:26:228-229.
43. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. *Oral Health*, 1998: 88:37-9.
44. Cohen, GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997:326:1-16.
45. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The Role of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory Bone Resorption. *J Endod*, 2007:33:432-6.
46. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*, 2015.
47. da Silva PT, Pappen FG, Souza EM, Dias JE, Bonetti Filho I, Carlos IZ, Leonardo RT. Cytotoxicity evaluation of four endodontic sealers. *Braz Dent J*, 2008: 19:228-31.
48. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod*, 2011: 37:372-5.
49. De Moor RJ, De Bruyne MA. The longterm sealing ability of AH 26 AH plus used with three guttapercha obturation techniques. *Quintessence Int*, 2004:35:326-31.
50. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxid-Based Root Canal Sealer: A Review. *J Endod*, 2009: 35:475-480.
51. DGZMK. Wurzelkanalfüllpasten und -stifte. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*, 2000: 55:9.
52. Docheva D, Padula D, Popov C, Weishaupt P, Prägert M, Miosge N, Hickel R, Böcker W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface. *Eur Cell Mater*, 2010: 19:228-41.
53. Dosseva-Panova VT, Popova CL, Panov VE. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia Med (Plovdiv)*, 2014: 56:152-60.

54. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003; 95:345-7.
55. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000; 289:1501-4.
56. Ducy, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn.*, 2000; 219:461-71.
57. Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Shear bond strength of three resin based sealers to dentin with and without the smear layer. *J Endod*, 2005; 31:293-6.
58. Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J*, 2007; 40:329-37.
59. Fenner, H. Immunopharmacologic profile and therapeutic prospects of anti-TNF-alpha therapy. *Z Rheumatol*, 1998; 57:294-7.
60. Forgione, S. A documentation of healing of overfilled cases in teeth with lesions of endodontic origin following treatment using the B.U. *Thesis, Boston University*. 1986.
61. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*, 2009; 189:144-52.
62. Frank RM, Voegel JC. Ultrastructure of the human odontoblast process and its mineralisation during dental caries. *Caries Res*, 1980; 14:367-80.
63. Funk JF, Matziolis G, Krockner D, Perka C. [Promotion of bone healing through clinical application of autologous periosteum derived stem cells in a case of atrophic non-union. *Z Orthop Unfall*, 2007; 145:790-4.
64. Funteas UR, Wallace JA, Fochtman EW. A comparative analysis of Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement. *Aust Endod J*, 2003; 29:43-4.
65. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater*, 2015; 13:43-60.
66. Gatewood, RS. Endodontic Materials. *Dent Clin North Am*, 2007; 51:695-712.
67. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*, 1986; 94:57-63.
68. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, Einhorn TA. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs*, 2001; 169:285-94.
69. Ghoneim AG, Lutfy RA, Sabet NE, Fayyad DM. Resistance to fracture of roots obturated with novel canal-filling systems. *J Endod*, 2011; 37:1590-2.
70. Giardino L, Pontieri F, Savoldi E, Tallarigo F. Aspergillus mycetoma of the Maxillary Sinus Secondary to Overfilling of a Root Canal. *J Endod*, 2006; 32:692-694.
71. Goetz FW, Planas JV, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. *Dev Comp Immunol*, 2004; 28:487-97.
72. Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. *J Dent*, 1995; 23:15-20.

73. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod*, 2009; 35:1577-9.
74. Gorduysus M, Avcu N. Evaluation of the radiopacity of different root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009; 108:135-40.
75. Gorny G, Shaw A, Oursler MJ. IL-6, LIF, and TNF-alpha regulation of GM-CSF inhibition of osteoclastogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 2004; 294:149-58.
76. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 2003; 74:391-401.
77. Guigand M, Glez D, Sibayan E, Cathelineau G, Vulcain JM. Comparative study of two canal obturation techniques by image analysis and EDS microanalysis. *Br Dent J*, 2005; 198:707-11.
78. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J*, 2013; 46:808-14.
79. Hegde V, Arora S. Fracture resistance of roots obturated with novel hydrophilic obturation systems. *J Conserv Dent*, 2015; 18:261-4.
80. Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. *Mol Neurobiol*, 2009; 40:15-32.
81. Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Sensitivity of different human cell line in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res*, 1981; 89:102-7.
82. Hirschberg CS, Patel NS, Patel LM, Kadouri DE, Hartwell GR. Comparison of sealing ability of MTA and EndoSequence Bioceramic Root Repair Material: a bacterial leakage study. *Quintessence Int*, 2013; 44:157-62.
83. Hosoya N, Takahashi G, Arai T, Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J Endod*, 2001; 27:343-6.
84. Huang FM, Kuan YH, Lee SS, Chang YC. Caspase activation by a zinc-oxide eugenol-based root-canal sealer in cementoblasts. *J Dent Sci*, 2015; 10:338–340.
85. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc-oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J*, 2002; 35:153-158.
86. Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod*, 2005; 31:679-83.
87. Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of Interleukin-6 and Interleukin-8 Gene Expression by Root Canal Sealers in Human Osteoblastic Cells. *J Endod*, 2005; 31:679-83.
88. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials*, 2002; 23:77-83.
89. Ingle, Beveridge, Glick, Weichman. Modern endodontic therapy. In *Endodontics Fourth*, von Bakland Ingle. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
90. *International Organisation of Standardization*. International Organisation of Standardization ISO 6876 dental root canal sealing materials. 2001.

91. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 1997; 64:295-312.
92. Jakab, L. Bone tissue: rebuilding and inflammation. *Orv Hetil*, 2014;155:1575-83.
93. Jeevani E, Jayaprakash T, Bolla N, Vemuri S, Sunil CR, Kalluru RS. Evaluation of sealing ability of MM-MTA, Endosequence, and biodentine as furcation repair materials: UV spectrophotometric analysis. *J Conserv Dent*, 2014;17:340-3.
94. Jones, SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 2005; 175:3463-8.
95. Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontal Res*, 2011;46:153-7.
96. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulp on germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1965; 20:340-9.
97. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, Bayırlı G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J*, 2011; 44:626-634.
98. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000; 18:621-63.
99. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRootMTA. *Head Face Med*, 2015;2;11:16.
100. Kenchappa M, Gupta S, Gupta P, Sharma P. Dentine in a capsule: Clinical case reports. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 2015; 33:250-4.
101. Kerschbaum T, Voss R. Practical efficacy of crowns and inlays. *Dtsch Zahnärztl Z*, 1981; 36:243-9.
102. Kim RJ, Shin JH. Cytotoxicity of novel mineral trioxide aggregated-based root canal sealer. *Dental Materials Journal*, 2014; 33:313-8.
103. Kim TG, Lee YH, Lee NH, Bhattarai G, Lee IK, Yun BS, Yi HK. The antioxidant property of pachymic acid improves bone disturbance against AH plus-induced inflammation in MC-3T3 E1 cells. *J Endod*, 2013;39:461-6.
104. Koch H, Jadlowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2005; 14:621-31.
105. Komori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev*, 1998; 8:494-9.
106. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997;89:755-64.
107. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*, 2006; 99:1233-9.
108. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001; 16:1004-14.

109. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Beltes P, Geromichalos GD, Kortsaris AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol*, 1998; 14:182-5.
110. Kwon SJ, Park YJ, Jun SH, Ahn JS, Lee IB, Cho BH, Son HH, Seo DG. Thermal irritation of teeth during dental treatment procedures. *Restor Dent Endod*, 2013; 38:105-12.
111. Laghios CD, Benson BW, Gutmann JL, Cutler CW. Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. *Int Endod J*, 2000; 33:311-5.
112. Langeland, K. Management of the inflamed pulp associated with deep carious lesion. *J Endod*, 1981; 7:169-81.
113. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod*, 2014; 40:1217-22.
114. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*, 1993; 19:541-4.
115. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*, 1996; 245:327-41.
116. Leonardo MR, da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol*, 1999; 15:28-32.
117. Levitan ME, Himel VT, Luckey JB. The effect of insertion rates on fill length and adaptation of a thermoplasticized gutta-percha technique. *J Endod*, 2003; 29:505-8.
118. Levy, GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J*, 1997; 11:234-47.
119. Lewis, B. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. *J Clin Pediatr Dent*, 1998; 22:167-77.
120. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2004; 14:1-41.
121. Lin L, Langeland K. Light and electron microscopic study of teeth with carious pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1981; 51:292-316.
122. Lin L, Shovlin F, Skribner J, Langeland K. Pulp biopsies from the teeth associated with periapical radiolucency. *J Endod*, 1984; 10:436-48.
123. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod*, 1992; 18:625-7.
124. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000*, 2010; 52:163-206.
125. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 2008; 36:1-9.
126. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod*, 2011; 37:673-7.
127. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod*, 2011; 37:793-8.

128. Machado J, Johnson JD, Paranjpe A. The Effects of Endosequence Root Repair Material on Differentiation of Dental Pulp Cells. *J Endod*, 2016;42:101-5.
129. Magloire H, Couble ML, Joffre A, Augier R. The dental pulp: structure and function. *Inf Dent*, 1983: 65:3473-85.
130. Malueg LA, Wilcox LR, Johnson W. Examination of external apical root resorption with scanning electron microscopy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1996: 82:89-93.
131. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1992: 73:729-37.
132. McKinney Jr, RV. Clarification of the terms granulomatous and granulation tissue. *J Oral Pathol*, 1981: 10:307-10.
133. McMichen FR, Pearson G, Rahbaran S, Gulabivala K. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *Int Endod J*, 2003;36:629-35.
134. Micheelis, Schiffner. Deutsche Mundgesundheitsstudie DMS IV. 2005.
135. Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal an AH plus compared during different setting periods. *J Endod*, 2005: 31:307-309.
136. Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod*, 2005: 31:307-9.
137. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod*, 2012: 38:1101-5.
138. Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod*, 2014: 40:1485-8.
139. Mosmann, T. Rapid Calorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*, 1983;65:55-63.
140. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 1997: 89:773-9.
141. Nair PN, Schroeder HE. Epithelial attachment at diseased human tooth-apex. *J Periodontal Res*, 1985: 20:293-300.
142. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*, 1996: 64:2371-80.
143. Nair U, Ghattas S, Saber M, Natera M, Walker C, Pileggi R. A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011: 112:74-7.
144. Nair, PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*, 2006: 39:249-81.
145. Nalamachu S, Wortmann R. Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: a review of the literature. *Postgrad Med*, 2014:126:92-7.

146. Nanes M, Pacifici R. Inflammatory cytokines. In *Bone resorption*, von Farach-Carson M, Rubin J Bronner F, 67-90 . New York : Springer , 2005.
147. Nelson DE, Ihekweba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science.*, 2004:306:704-8.
148. Nichols BG, Woods JS, Luchtel DL, Corral J, Koenig JQ. Effects of ozone exposure on nuclear factor-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression in human nasal epithelial cells. *Toxicol Sci*, 2001:60:356-62.
149. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2007:43:85-101.
150. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 1995:66:1025-31.
151. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, 1999:48:913-27.
152. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod*, 1998:24:91-6.
153. Palermo AT, Labarge MA, Doyonnas R, Pomerantz J, Blau HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*, 2005:279:336-44.
154. Partovi M, Al-Havvaz AH, Soleimani B. In vitro computer analysis of crown discolouration from commonly used endodontic sealers. *Aust Endod J*, 2006:32:116-9.
155. Patel N, Best SM, Bonfield W, Gibson IR, Hing KA, Damien E, Revell PA. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med*, 2002:13:1199-206.
156. Petrou MA, Welk A, Alhaddad F, Altarabulsi MB, Alkilzy M, Splieth CH. Indirekte Pulptherapie im Milchgebiss: Kalziumhydroxid, Portland Cement oder MTA. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 2014.
157. Pinero GJ, Kiatpongsah S, Hutchins MO, Hoover J. The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. *J Endod*, 1983:9:2-7.
158. Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, Dettori C, Pashley DH, Tay FR. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *J Endod*, 2008:34:1085-8.
159. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999:284:143-7.
160. Pitts DL, Matheny HE, Nicholls JI. An in vitro study of spreader loads required to cause vertical root fracture during lateral condensation. *J Endod*, 1983:9:544-50.
161. Pommel L, Camps J. In vitro apical leakage of system B compared with other filling techniques. *J Endod*, 2001:27:449-51.
162. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater*, 2015:31:351-70.

163. Raisz, LG. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999: 7:419-21.
164. Ram VS, Parthiban, Sudhakar U, Mithradas N, Prabhakar R. Bonebiomarkers in periodontal disease: a review article. *J Clin Diagn Res*, 2005: 9:7-10.
165. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006: 101:258-61.
166. Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol Biol*, 2011: 740:103-14.
167. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000: 223:22-38.
168. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater*, 2007: 24:149-64.
169. Rocha Lima TF, Nagata JY, de Souza-Filho FJ, de Jesus Soares A. Post-traumatic complications of severe luxations and replanted teeth. *J Contemp Dent Pract*, 2015: 16:13-9.
170. Rödiger T, Attin T, Hülsmann M. Die Wurzelkanalsealer AH 26, AH Plus und RoekoSeal - Eine Literaturübersicht. *Endodontie Quintessenz*, 2005: 14:153-176.
171. Roggendorf, MJ. AH Plus und AH Plus Jet in der praktischen Anwendung. *ZMK*, 2006.
172. Ruddle, CD. Nickel-Titanium rotary instruments: current concepts for preparing the root canal system. *Aust Endod J*, 2003: 29:87-98.
173. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 1999: 107:489-506.
174. Saito T, Toyooka H, Ito S, Crenshaw MA. In vitro study of remineralization of dentin: effects of ions on mineral induction by decalcified dentin matrix. *Caries Res*, 2003: 37:445-9.
175. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. *J Endod*, 2004: 30:846-50.
176. Salz U, Poppe D, Sbicego S, Roulet JF. Sealing properties of a new root canal sealer. *Int Endod J*, 2009: 42:1084-9.
177. Scelza MZ, Coil J, Alves GG. Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Braz Oral Res*, 2012: 26:424-30.
178. Schäfer E, Hickel R, Geurtsen W, Heidemann D, Löst C, Petschelt A, Raab W. Wurzelkanalaufbereitungen. *Stellungnahme der DGZMK/DGZ V 1.0, Stand 4/00*, 1999.
179. Schäfer. Struktur der Pulpa und ihre Erkrankungsformen. In *Praxis der Zahnheilkunde Endodontie*, von Detlef Heidemann, 1-24. München/Jena: Urban&Fischer, 2001.

180. Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W, Milz S. The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J Anat*, 2004: 204:133-9.
181. Schilder H, Goodman A, Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. Part V. Volume changes in bulk gutta-percha as a function of temperature and its relationship to molecular phase transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1985: 59:285-96.
182. Schilder, H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am*, 1967: 723-44.
183. Schmalz, G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 1998: 106:696-706.
184. Schroeder. *Pathobiologie oraler Strukturen*. Basel, München, Paris, London, New York: S. Karger, 1991.
185. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc*, 1999: 130:967-75.
186. Schweikl H, Schmalz G, Stimmelmayer H, Bey B. Mutagenicity of AH26 in an in vitro mammalian cell mutation assay. *J Endod*, 1995:21:407-10.
187. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1963: 16:969-77.
188. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986:47:921-8.
189. Shokouhinejad N, Nekoofer MH, Razmi H, Sajadi S, Davies TE, Saghiri MA, Gorjestani H, Dummer PM. Bioactivity of EndoSequence root repair material and bioaggregate. *Int Endod J*, 2012: 45:1127-34.
190. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*, 1990: 16:498-504.
191. Skidmore LJ, Berzins DW, Bahcall JK. An in vitro comparison of the intraradicular dentin bond strength of Resilon and gutta-percha. *J Endod*, 2006:32:963-6.
192. Slaus G, Bottenberg P. A survey of endodontic practice amongst Flemish dentists. *Int Endod J*, 2002: 35:759-67.
193. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 2000: 69:145-82.
194. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res*, 1988: 67:66-70.
195. Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol*, 1990: 35:241-7.
196. Spångberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde. *J Endod*, 1993: 19:596-8.
197. Srinivasan V, Waterhouse P, Whitworth J. Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry. *Int J Paediatr Dent*, 2009: 19:34-47.
198. Stańczyk J, Kowalski ML. The role of cyclooxygenase and prostaglandins in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Pol Merkur Lekarski*, 2001:11:438-43.

199. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol*, 2004: 26:179-84.
200. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1998: 9:498-521.
201. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*, 2000: 1477:299-306.
202. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*, 1998: 1387:17-31.
203. Stiehler M, Lind M, Mygind T, Baatrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H, Foss M, Besenbacher F, Kassem M, Bünger C. Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces. *J Biomed Mater Res A*, 2008: 86:448-58.
204. Stoddart, MJ. WST-8 analysis of cell viability during osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 2011: 740:21-5.
205. Stopper H, LutzWK. Induction of micronuclei in human cell lines and primary cells by combination treatment with gamma-radiation and ethyl methanesulfonate. *Mutagenesis*, 2002: 17:177-81.
206. Sun HW, Feigal RJ, Messer HH. Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. *Pediatr Dent*, 1990: 12:303-7.
207. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*, 2006: 39:415-22.
208. Testori T, Capelli M, Milani S, Weinstein RL. Success and failure in periradicular surgery: a longitudinal retrospective analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1999: 87:493-8.
209. Tinkl S, Bocskay S, Kovács A. Comparative morphological and microbiological studies in different forms of dental pulp inflammation. *Rev Chir Oncol Radiol O R L Oftalmol Stomatol Ser Stomatol*, 1977: 24:87-90.
210. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*, 1995: 21:349-53.
211. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. 1997. *Int Endod J*, 2009: 42:408-11.
212. Torneck, CD. A report of studies into changes in the fine structure of the dental pulp in human caries pulpitis. *J Endod*, 1981: 7:8-16.
213. Tziafa C, Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tziafas D. Dentinogenic Activity of Biodentine in Deep Cavities of Miniature Swine Teeth. *J Endod*, 2015: 41:1161-6.
214. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. Bacteroides endodontalis and other black-pigmented bacteroides species in odontogenic abscesses. *Infect Immun*, 1985: 49:494-7.
215. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol*, 2015: 78:202-8.
216. Wang N, Li H, Wang J, Chen S, Ma Y, Zhang Z. Study on the anticorrosion, biocompatibility, and osteoinductivity of tantalum decorated with tantalum oxide nanotube array films. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012: 4:4516-23.

217. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dent Mater*, 2014: 30:1-16.
218. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*, 2014:40:505-8.
219. Weckwerth PH, Lima FL, Greatti VR, Duarte MA, Vivan RR. Effects of the association of antifungal drugs on the antimicrobial action of endodontic sealers. *Braz Oral Res*, 2015.
220. Wesselink PR, Kersten HW. Root canal filling. *Nederlands tijdschrift voortandheelkunde*, 1989.
221. Wesselink, PR. Die Wurzelkanalfüllung (II). *Endodontie* 4, 1995.
222. Willershausen I, Callaway A, Briseño B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med*, 2011.
223. Wilson AD, Clinton DJ, Miller RP. Zinc oxide-eugenol cements: IV. Microstructure and hydrolysis. *J Dent Res*, 1973: 52:253-60.
224. Wilson BL, Baumgartner JC. Comparison of spreader penetration during lateral compaction of .04 and .02 tapered gutta-percha. *J Endod*, 2003:29:828-31.
225. Wu MK, Kast'áková A, Wesselink PR. Quality of cold and warm gutta-percha fillings in oval canals in mandibular premolars. *Int Endod J*, 2001:34:485-91.
226. Wu MK, Wesselink PR, Boersma J. A 1-year follow-up study on leakage of four root canal sealers at different thicknesses. *Int Endod J*, 1995:28:185-9.
227. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod*, 2004:30:95-9.
228. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, 2007: 41:928-36.
229. Yu MK, Lee YH, Yoon MR, Bhattarai G, Lee NH, Kim TG, Jhee EC, Yi HK. Attenuation of AH26-induced apoptosis by inhibition of SAPK/JNK pathway in MC-3T3 E1 cells. *J Endod*, 2010: 36:1967-71.
230. Zaitseva OV, Shandrenko SG, Veliky MM. Biochemical markers of bone collagen type I metabolism. *Ukr Biochem J*, 2015: 87:21-32.
231. Zhang L, Tran N, Chen HQ, Wang X. Cyclic stretching promotes collagen synthesis and affects F-actin distribution in rat mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng*, 2008: 18:205-10.
232. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod*, 2015:41:56-61.
233. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod*, 2013: 39:1281-6.
234. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*, 2001: 108:99-103.
235. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 2015.
236. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011: 112:657-61.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Darstellung der Prostaglandin E ₂ -Synthese und dessen Wirkungen (modifiziert nach Hein und O'Banion, 2009).....	10
Abbildung 2: Aktivierungsweg von NFκB (Brasier, 2006)	12
Abbildung 3: Mechanismus der WST-8 Umsetzung durch Dehydrogenasen in lebenden Zellen (PromoKine, Heidelberg, Deutschland)	39
Abbildung 4: Aktivierungswege der Caspasen (nach Logue und Martin, 2008)	40
Abbildung 5: Schematische Darstellung zur Entstehung von Mikronuklei (modifiziert nach Al-Sabti und Metcalfe, 1995).....	42
Abbildung 6: Standard-Verdünnungsreihe des PGE ₂ EIAs (ENZO Life Sciences)	45
Abbildung 7: Standardkurve zur Ermittlung der PGE ₂ -Konzentration (ENZO Life Sciences)	47
Abbildung 8: Standard-Verdünnungsreihe des IL-6 ELISAs (R&D Systems).....	48
Abbildung 9: Standardverdünnungsreihe des Osteocalcin ELISAs (R&D Systems)	52
Abbildung 10: Ergebnisse des WST-8-Testes zur Untersuchung der Zytotoxizität der Sealereluat	56
Abbildung 11: Ergebnisse des Caspase-3-Assays zur Bestimmung der Apoptoseinduktion durch Sealereluat.....	57
Abbildung 12: Ergebnisse des Mikronukleus-Assays zur Untersuchung der Genotoxizität der Sealer.....	58
Abbildung 13: Ergebnisse des PGE ₂ -ELISAs, ^a p < 0,0001 (Tukey-HSD Post-Hoc-Test).60	
Abbildung 14: Ergebnisse des IL-6 ELISAs, ^a p = 0,034; ^b p = 0,046 (LSD Post-Hoc-Test)	61
Abbildung 15: repräsentative Western Blot-Analyse auf Actin (oben) und iκBα (unten) ...	62
Abbildung 16: Ergebnisse des Osteocalcin-ELISAs bei hMSC und hPDSC-hTERT (* p = 0,002; + p = 0,016; # p = 0,018, LSD Post-Hoc-Test).....	63
Abbildung 17: Western Blot-Analysen auf Cyclin B (oben) und RUNX2 (unten)	64
Abbildung 18: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (links Actin, rechts Lamin B2)	65
Abbildung 19: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (links Fibronectin, rechts Osteonectin)	65

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der Färbung nach Feulgen	44
Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzversuche	55

10 Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	minimal essentielles Medium
BGP	Bone-Gla-Protein (bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein)
BSA	bovines Serumalbumin/ Rinderalbumin
COX-2	Cyclooxygenase-2
DEVD-pNA	Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat/ Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMS	Ethylmethansulfonat
HGF-1	humane Gingivafibroblasten
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hOB	humane Osteoblasten
hPDL	human periodontal ligament cell
hPDLF	humane Parodontalligamentfibroblasten
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ISO	International Organisation for Standardization
LPS	Lipopolysaccharide
MTA	Mineral Trioxid Aggregat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
OPN	Osteopontin
PBS	phosphate buffered saline/ Phosphat gepufferte Salzlösung
PDSC-hTERT-Zellen	Parodontalligament - humane Telomerase reverse Transkriptase Zellen

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pNA	p-Nitroanilid
pNpp	para-Nitrophenyl-phosphat
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RNA	ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS-T	tris buffered saline with tween/ Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Total Fill BCS	Total Fill BC Sealer
Total Fill RRM	Total Fill Root Repair Material
WST	water soluble tetrazolium salt/ wasserlösliches Tetrazolium Salz
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
VEGF	Vaskular endothelial growth factor

11 **Rezepte**

Herstellung der Puffer

1. 10X Tris-Glycin-SDS Laufpuffer (für SDS-PAGE)

Zur Herstellung des 10X Tris-Glycin-SDS Laufpuffers werden 30,3 g Tris-Base, 144,1 g Glycin und 10 g SDS in 600 ml Reinstwasser gelöst und im Anschluss mit Reinstwasser auf 1000 ml aufgefüllt.

2. 10X Tris-Glycin Transferpuffer (nach Towbin)

Hierzu werden 30,3 g Tris-Base und 144,1 g Glycin in 600 ml Reinstwasser gelöst und mit Reinstwasser auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Um daraus 1 l 1X-Puffer herzustellen werden 80 ml des 10X Puffers mit Reinstwasser auf 800 ml aufgefüllt und 200 ml Methanol dazugegeben.

3. Ladepuffer nach Laemmli 4X

Zunächst wurden 2 ml 1M Tris-HCL Lösung hergestellt, indem 12,1 g Tris-Base in 100 ml H₂O gelöst wurden und mit Hilfe von HCl ein pH-Wert von 6,8 eingestellt wurde. Zusätzlich enthielt der Ladepuffer 0,8 g SDS, 4 ml Glycerol (100%), 0,4 ml 14,7 M β -Mercaptoethanol, 1 ml 0,5 M EDTA und 8 mg Bromophenolblau.

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller notwendigen Mittel zur Durchführung der Versuche danken und die schnelle Korrektur der Arbeit danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät, dass ich diese Arbeit in seinem Hause durchführen durfte.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Maximilian Kollmuß für die fachlich und menschlich ausgezeichnete Betreuung. Er war mir sowohl durch seine kompetenten Anleitungen und Erfahrungen im Labor, als auch im Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten eine sehr große Hilfe. Vielen Dank für den hohen persönlichen Einsatz, die zahlreichen Korrekturen sowie kritischen und qualifizierten Ratschläge und für das Beantworten aller Fragen.

Weiterer Dank gilt meiner Familie, die mir immer beistanden und mich unterstützten.

Eidesstattliche Versicherung

Forstner, Teresa Elisabeth

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Untersuchung des Einflusses von neuen endodontischen
Sealern auf orale Zellen *in vitro*: Toxizitätsanalysen,
Entzündungskaskade und mögliches regeneratives Potential“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.03.2017